



UNIVERSIDAD DE CUENCA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

TITULO:

“Diversidad de las comunidades de bacterias y hongos en suelos de cultivos de cacao (*Theobroma cacao L.*) y café (*Coffea arábica*) bajo manejo orgánico y convencional”

**TESIS PREVIA A LA OBTENCION DEL TITULO DE
INGENIERA AGRONÓNOMA**

AUTOR: Silvia Liliana Ordoñez Tenesaca

CI: 0929079416

DIRECTOR: Ing. Eduardo José Chica Martínez Ph.D

CI: 0912795101

CUENCA, ECUADOR

2017



UNIVERSIDAD DE CUENCA

RESUMEN

En el suelo habitan una gran cantidad de organismos que desarrollan diversas funciones ecológicas, muchas de las cuales son importantes para el crecimiento y desarrollo de las plantas. De estas especies menos del 1% han sido cultivadas o caracterizadas, siendo el suelo uno de los ecosistemas más diversos y menos estudiados del planeta. Para comprender y aprovechar los efectos favorables de los microorganismos del suelo, es necesario primero conocerlos y caracterizarlos. El presente estudio se realizó, con el objetivo de determinar si existen diferencias entre la diversidad y estructura de las comunidades microbianas del suelo en cultivos de cacao y café manejados de forma orgánica y convencional. El trabajo se llevó a cabo analizando 6 pares de muestras de suelo en los primeros 10 cm de la zona rizosférica, a partir de las cuales se extrajo el ADN metagenómico. Fragmentos de ADN ribosomal 16S (de bacterias) y de la región ITS (de hongos) fueron amplificadas por PCR, con cebadores universales. Además, mediante la técnica de DGGE se obtuvieron imágenes de los perfiles de diversidad. A partir de estos perfiles, se estimaron índices de diversidad y las estructuras de las comunidades bacterianas y fúngicas de las muestras, fueron comparadas usando análisis de agrupamiento jerárquicos. Los resultados obtenidos no muestran diferencias significativas a nivel de las comunidades microbianas ni tampoco en las propiedades físico-químicos entre los dos sistemas de manejo evaluados.

PALABRAS CLAVES: DGGE, PCR, BACTERIAS, HONGOS, DIVERSIDAD Y COMPOSICIÓN MICROBIANA, RIZÓSFERA.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

ABSTRACT

Soils are populated by a large number of organisms that develop diverse ecological functions, many of which are important for plant growth and development. Of these species less than 1% have been cultivated or characterized, being the soil one of the most diverse and least studied ecosystems on the planet. To understand and take advantage of favorable effects of soil microorganisms, they must be described and characterizes first. This study was conducted to determine whether soil microbial communities differed in their diversity indexes and structure between organically and conventionally managed cocoa and coffee crops. Six pairs of soil samples collected from the top 10 cm of these crops root zone were analyzed. DNA was extracted from these samples and fragments of 16S bacterial ribosomal DNA and fungal ITS region DNA were amplified by PCR using universal primers. Afterwards, the PCR products were electrophoresed using DGGE. From the DGGE profiles diversity indexes were calculated and the structures of the communities in all the samples compared using hierarchical cluster analysis. No significant differences in diversity indexes, or explicative clusters were detected between the two management systems evaluated.

KEY WORDS: DGGE, PCR, BACTERIUM, FUNGI, DIVERSITY AND MICROBIAL COMPOSITION, RIZOSPHERE.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
ÍNDICE DE CONTENIDO	3
ÍNDICE DE TABLAS	5
ÍNDICE DE FIGURAS	6
ÍNDICE DE ANEXOS	7
ABREVIATURAS Y SIMBOLOGIA	8
DEDICATORIA	11
AGRADECIMIENTOS	12
1. INTRODUCCIÓN	13
2. JUSTIFICACIÓN	15
3. OBJETIVOS	16
3.1 Objetivo General	16
3.2 Objetivos Específicos	16
4. HIPÓTESIS	16
5. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	17
5.1 Comunidades Microbianas del Suelo	17
5.2 Microorganismos en la Rizósfera	18
5.3 Comunidades Microbianas en Suelos Agrícolas	18
5.3.1 Sistemas de Manejo Orgánico y Convencional.	18
5.3.2 Estudios Relacionados	19
5.4 Herramientas Moleculares para el Estudio de la Biodiversidad del Suelo ...	20
6. MATERIALES Y MÉTODOS	22
6.1 Sitios de Muestreo y Recolección de Muestras	22



UNIVERSIDAD DE CUENCA

6.2	Análisis Molecular	23
6.2.1	Extracción de ADN Metagenómico	23
6.2.2	PCR (Polymerase Chain Reaction)	23
6.2.3	Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (DGGE)	26
6.2.4	Índices de Diversidad	27
6.2.5	Comparación de las Comunidades Microbianas	27
6.3	Determinación de las Propiedades físico-químicas de los Suelos.	28
6.4	Análisis Estadístico	29
7.	RESULTADOS	30
7.1	Resultados en Análisis Molecular	30
7.1.1	Extracción de ADN Metagenómico	30
7.1.2	Amplificación – PCR	31
7.1.3	Gel con Gradiente Desnaturalizante.....	32
7.2	Índices de Diversidad	34
7.3	Índices de Composición	36
7.3.1	Dendogramas de Agrupamiento: 16 S – ITS	37
7.4	Análisis Físicos de los suelos.....	39
	Convencional	40
8.	DISCUSIÓN.....	41
9.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	44
10.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	45
11.	ANEXOS	54



UNIVERSIDAD DE CUENCA

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Fases térmicas tiempo y ciclos de PCRs en 16 S, ITS e ITS anidada.	24
Tabla 2: Concentración y volumen para PCR de gen 16S - 50 µl.	25
Tabla 3: Concentración y volumen para PCR región ITS- 20 µl.	25
Tabla 4: Concentración y volumen - PCR región ITS anidada-50 µl.	26
Tabla 5: Metodología empleada en los análisis físicos de los suelos	28
Tabla 6: índices de Diversidad en Bacterias (16S) Riqueza (S), Índice de Shannon (H) e Índices de Equitabilidad de Shannon (EH).	36
Tabla 7: índices de Diversidad en Hongos (ITS) Riqueza (S), Índice de Shannon (H) e Índices de Equitabilidad de Shannon (EH).	36
Tabla 8: Análisis físico-químico en los cultivos de cacao y café en suelos bajo manejo orgánico y convencional.	40



UNIVERSIDAD DE CUENCA

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Localización de los sitios de muestreo.....	22
Figura 2: Bandas de ADN metagenómico.....	30
Figura 3: Productos de amplificación por PCR de la región 16S (bacterias) en gel de agarosa 1% (w/v).	31
Figura 4: Productos de la primera amplificación por PCR de la región ITS en gel de agarosa 1% (w/v).	31
Figura 5: productos de la segunda amplificación por PCR de la región ITS en gel de agarosa 1% (w/v).	32
Figura 6: Perfil de diversidad del gen 16S ADN _r , con gradiente desnaturalizante 35-55%.	33
Figura 7: Perfil de diversidad de la región ITS (hongos) con gradiente desnaturalizante 20-35%.	34
Figura 8: Dendogramas de bacterias (16S) a) UPGMA b) WPGMA c) Single Linkage d) Neighbour Joining e) Complete Linkage.	37
Figura 9: Dendogramas en hongos (ITS) a) UPGMA b) WPGMA c) Single Linkage d) Neighbour Joining e) Complete Linkage.	38



UNIVERSIDAD DE CUENCA

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Café Orgánico Yunguilla 1	54
Anexo 2: Café Convencional Yunguilla 1	54
Anexo 3: Café Orgánico Guachapala – Romeral	55
Anexo 4: Café Convencional Guachapala - Romeral.....	55
Anexo 5: Café Orgánico Yunguilla 2	56
Anexo 6: Café Convencional Yunguilla 2	56
Anexo 7: Cacao Orgánico Tamarindo 1	57
Anexo 8: Cacao Convencional Tamarindo 1	57
Anexo 9: Cacao Orgánico Naranjal	58
Anexo 10: Cacao Convencional Naranjal.....	58
Anexo 11: Análisis físicos de los suelos 1	59
Anexo 12: Análisis físicos de los suelos 2.....	59
Anexo 13: Electroforesis en gel de agarosa.....	60



UNIVERSIDAD DE CUENCA

ABREVIATURAS Y SIMBOLOGIA

DGGE: Gel con gradiente desnaturalizante

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

OTU: Unidad taxonómica operacional



Silvia Liliana Ordoñez Tenesaca autora del Trabajo de Titulación “Diversidad de las comunidades de bacterias y hongos en suelos de cultivos de cacao (*Theobroma cacao* L.) y café (*Coffea arabica*) bajo manejo orgánico y convencional”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad del autor.

Cuenca, 17 abril del 2017

Silvia Liliana Ordoñez Tenesaca

C.I: 0929079416



Silvia Liliana Ordoñez Tenesaca autora del Trabajo de Titulación “Diversidad de las comunidades de bacterias y hongos en suelos de cultivos de cacao (*Theobroma cacao* L.) y café (*Coffea arábica*) bajo manejo orgánico y convencional”, reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Ingeniera Agrónoma. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora.

Cuenca, 17 abril del 2017

Silvia Liliana Ordoñez Tenesaca

C.I: 0929079416



UNIVERSIDAD DE CUENCA

DEDICATORIA

Con infinito agradecimiento y cariño dedico este trabajo de investigación a mis queridos padres: Manuel Ordoñez y María Tenesaca, a mis queridos hermanos: Blanca Ordoñez, Jinson Ordoñez y Yazmin Ordoñez, quienes han sido un apoyo constante, no solo en mi carrera universitaria si no a lo largo de mi vida; ellos son quienes desde el principio de mi vida me han formado y apoyado a que sea la persona que soy ahora.

A mis amados sobrinos: Madison Ordoñez y Alex Lojano, quienes son las dos personas más jóvenes de la familia y espero que algún día también puedan cumplir cada una de las metas que se propongan en la vida. Finalmente, a mí respetada familia y a Dios.

Liliana Ordoñez



UNIVERSIDAD DE CUENCA

AGRADECIMIENTOS

Un profundo agradecimiento a mi director de tesis, Eduardo Chica Martínez, quien ha sido la persona idónea para guiarme a lo largo de mi tesis, por su carácter motivante y sus sólidos conocimientos. Además, a los doctores Andrés Yarzabal y Antonio Vallecillo y todos los compañeros del área de biología molecular, quienes son un buen grupo de trabajo y amigos; y a todos quienes conforman el laboratorio de Propagación in vitro de Plantas de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca.

A mi querida Universidad de Cuenca, quien me permitió vivir y experimentar en diversos campos: académicos, deportistas, sociales, culturales y políticos, siendo estudiante de la Facultad de Ciencias Agropecuaria en la Carrera de Ingeniería Agronómica.

Además, agradezco con mucho cariño a cada uno de mis profesores, compañeros y amigos que he tenido a lo largo de mi carrera universitaria, y especialmente a Bruno Villegas quien me ha acompañado y apoyado con paciencia y apego en el proceso de titulación y vida personal.

Liliana Ordoñez



UNIVERSIDAD DE CUENCA

1. INTRODUCCIÓN

El cacao es un cultivo que tiene gran importancia histórica y económica para el Ecuador (Sotomayor 2011), considerándose como el producto de exportación más antiguo del país (Rosero 2002). Según la Asociación Nacional de Exportadores de Cacao, en el Ecuador se cultivan más de 500 000 ha de cacao, alcanzando las exportaciones ecuatorianas en el año 2015, 260 000 t de cacao en grano y productos derivados (ANECACAO 2015). El 90% de la producción de cacao en el Ecuador se realiza por pequeños y medianos agricultores (Sotomayor 2011). La Organización Internacional del Cacao (ICCO) menciona, que la última década se ha caracterizado por grandes fluctuaciones tanto en la producción como en la demanda de este rubro (ICCO 2010).

Así mismo, según el Instituto de Promoción de Exportaciones e Inversiones (PROECUADOR), el Ecuador posee una gran capacidad como productor de café. De hecho, nuestro país se ha convertido en uno de los 17 países exportadores que producen las dos especies comerciales de café -arábigo y robusta- con una superficie total cultivada de 375 000 ha, correspondiendo el 62% al café arábigo y el 38% a la producción del café robusta. Debido a su gran diversidad de ecosistemas, el cultivo de café se desarrolla en todas las regiones del Ecuador (PROECUADOR 2013).

Uno de los factores más importantes que afectan la productividad de los suelos agrícolas son las funciones llevadas a cabo por los microbios del suelo. Los microorganismos del suelo, como las bacterias, hongos, algas, protozoos y nematodos participan varios procesos, incluyendo la descomposición de la materia orgánica, formación de humus, la transformación y el reciclaje de nutrientes, siendo vitales, en el mantenimiento de la productividad del suelo (Lin et al. 2004). La importancia del manejo de la microbiología del suelo para modular la fertilidad del mismo se conoce desde hace muchos años, mientras que su influencia en la calidad del suelo se ha enfatizado más recientemente (Visser y Parkinson 1992).

Por otro lado, diversas funciones ecológicas proporcionadas por los microorganismos no han sido aún del todo comprendidas (Mocali y Benedetti 2010) y el conocimiento de las comunidades microbianas subterráneas sigue siendo



UNIVERSIDAD DE CUENCA

limitada (Heemsbergen et al. 2004) a pesar de su importancia para la función del ecosistema (Wardle et al. 2004).

La estabilidad del funcionamiento de los ecosistemas se ha convertido en un problema cada vez más importante y urgente debido a la creciente pérdida de biodiversidad que surge como resultado de intensas actividades humanas como la agricultura (Ushio et al. 2013). Aunque el uso de fertilizantes químicos ha llevado a una mejora en la producción agrícola, varios efectos perjudiciales relacionados con la salud y el medio ambiente, entre ellos el suelo, se han asociado con este tipo de productos (Ejaz et al. 2004). Además, Acosta et al. (2007) mencionan que la calidad y manejo del suelo, genera cambios significativos sobre las comunidades microbianas del suelo.

Entre los factores que participan en la formación del suelo podemos mencionar: precipitación, temperatura, viento, humedad y materia orgánica. La materia orgánica, según Jaramillo (2002), afecta las propiedades físico-químicas del suelo de diferente manera:

Humedad: el contenido de humus en el suelo, mejora la infiltración, la actividad química y biológica del suelo y reduce las pérdidas de agua por evaporación.

Color: el humus le transmite su color oscuro al suelo; este color aumenta la absorción de radiación facilitando su calentamiento, mejora la eficiencia de los procesos químicos y al desarrollo de organismos.

Estructura: el humus favorece la formación de agregados, mejorando la aireación, porosidad, permeabilidad, infiltración, y desarrollo radicular; además, se reduce la erosión y la densidad aparente.

pH: su valor puede disminuir al aumentar el contenido de humus.

De este modo, el crecimiento y la actividad de los microorganismos dependen de varias propiedades del suelo que los alberga, incluyendo pH, conductividad eléctrica, textura, estructura, temperatura, contenido de agua del suelo, etc., y son indicadores sensibles de cambios en el suelo (Lin et al. 2004).



UNIVERSIDAD DE CUENCA

2. JUSTIFICACIÓN

Los microorganismos suelen ejercer una acción específica cuando se relacionan con una especie vegetal (Benítez et al. 2007). Además, la riqueza así como la abundancia de las comunidades microbianas presentes en el suelo dependen tanto del sistema de manejo como del tipo cultivo (Torsvik y Øvreås 2002). Para comprender y aprovechar los efectos favorables de los organismos del suelo es necesario primero conocer su identidad y caracterizar sus funciones. Pero además, este ecosistema encierra un gran potencial para el descubrimiento de agentes biológicos (organismos, genes, proteínas, metabolitos) de utilidad para la agricultura, medicina, biotecnología, remediación ambiental e industrias (Handelsman et al. 1998).

Tradicionalmente los estudios de microbiología de suelos han utilizado técnicas de aislamiento y cultivo para identificar a los organismos que componen la biota del suelo y asociar funciones específicas a ellos (Daniel 2004). Sin embargo, la gran mayoría de los microorganismos son difíciles de cultivar por métodos tradicionales. Con esto se puede decir que, pese a ser uno de los ecosistemas más diversos del planeta, el suelo es uno de los menos estudiados (Daniel 2004).

Adicionalmente, los recientes avances en taxonomía, ofrecen un nuevo enfoque para analizar la estructura de hongos y bacterias (May et al. 2001). Los perfiles de ADN generados a través del empleo de técnicas denominadas “moleculares” son generalmente más detallados, precisos y rápidos de obtener que los perfiles morfológicos, pues no requieren esporulación o cultivo, y pueden además detectar todos los estadios de vida de los microorganismos (Burgess et al. 2009). Por ende, la diversidad microbiana evaluada mediante enfoques morfológicos está siendo subestimada, en comparación con los resultados obtenidos a través de enfoques moleculares (Muyzer y Smalla 1998). En el Ecuador no se han publicado estudios relacionados con la composición, riqueza y diversidad de las comunidades microbianas de suelos de cultivos de cacao y café bajo sistemas de manejo orgánico y convencional. Esto debido principalmente al carácter no cultivable de una gran cantidad de microorganismos del suelo (Escalante, et al. 2004).



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Por esta razón, es ventajoso utilizar técnicas moleculares, como la electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE, por sus siglas en inglés) que no requieren del aislamiento y cultivo previo de los microorganismos, para poder caracterizar las comunidades complejas de microorganismos que colonizan los suelos (Sabree 2009).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

- Determinar semejanzas y diferencias en la composición de comunidades microbianas en suelos de cultivos de cacao (*Theobroma cacao.*) y café (*Coffea arabica*) bajo sistemas de manejo orgánico y convencional.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar índices de diversidad de las comunidades microbianas que habitan en suelos de cultivos de cacao y café bajo sistemas de manejo orgánico y convencional.
- Comparar la composición de las comunidades microbianas entre suelos bajo manejo de sistemas de manejo orgánico convencional.
- Identificar las propiedades físicas en suelos de cultivos de cacao y café bajo sistemas de manejo orgánico y convencional.

4. HIPÓTESIS

Existen diferencias significativas en la composición de las comunidades microbianas en suelos con cultivos de cacao y café bajo sistemas de manejo orgánico y convencional.



5. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

5.1 Comunidades Microbianas del Suelo

El suelo constituye un ecosistema muy diverso e importante en el planeta (Estrade et al. 2010) y además conforma un sistema complejo en equilibrio dinámico, que alberga una gran cantidad y diversidad de microorganismos, como bacterias, hongos, protozoos y algas (De Felipe Antón 2004, Suárez 2010, Hernández et al. 2010). Se estima que en el suelo existen miles de especies organizadas en poblaciones y comunidades cuyo tamaño oscila entre los 100 y los 2.000 millones de individuos por gramo. Se ha estimado que dichas comunidades pueden contener aproximadamente 35.000 especies de bacterias y 1'500.000 especies de hongos, aunque sólo se han identificado entre un 8% y un 1% de estas respectivamente (Montaño et al. 2010). Los microorganismos, cumplen un rol fundamental en el subsistencia del suelo, pues participan en varios procesos en el ecosistema (Nogales 2005). Además, en la estimulación del crecimiento vegetal y supresión de ciertas enfermedades de las plantas (Higa y Parr 1994).

Sin embargo, cerca del 99% de los microorganismos no son cultivables por métodos tradicionales y tan solo entre 0.001% y un 1% son cultivables (Torsvik y Øvreås 2002, Nogales 2005). Por esta razón aún siguen habiendo importantes incógnitas que resolver en cuanto al conocimiento de la composición y estructura de las comunidades microbianas del suelo, los cambios que se producen en dichas comunidades en respuesta a diferentes factores ambientales y la funcionalidad de los diferentes tipos de microorganismos que integran la comunidad (Nogales 2005).

Varios autores, como por ejemplo (Rucks et al. 2004) indican, que las propiedades físicas del suelo (forma, tamaño, color, temperatura, textura, humedad, porosidad y densidades) están directamente relacionadas con el desarrollo de las plantas, es por esto que las propiedades físicas de los suelos determinan la rigidez, la fuerza y facilidad de sostenimiento y penetración de las raíces, además de la aireación, capacidad de drenaje y de almacenamiento de agua, plasticidad, y retención de nutrientes del suelo. Por otro lado, se ha detectado que un suelo fértil es aquel que tiene concentraciones de nutrientes minerales en niveles apropiados para el crecimiento y desarrollo normal de las plantas, sin limitaciones de acidez, o de tipo físico (Bautista y Palacio 2005).



UNIVERSIDAD DE CUENCA

La composición de las comunidades microbianas del suelo, está determinada por factores ambientales como la temperatura, la humedad, la disponibilidad de O₂ y el pH (Eilers et al. 2012). Los cambios en estos factores pueden dar origen a adaptaciones en grupos microbianos específicos, pero también pueden afectar sus propiedades funcionales (Waldrop y Firestone 2006). En la mayoría de los suelos, los factores edáficos, incluyendo el pH, los niveles de nutrientes, la cantidad y calidad de la materia orgánica del suelo, cambian con la profundidad de horizonte a horizonte (Eilers et al. 2012, Rumpel y Kögel 2011). A medida que profundizamos también disminuye la biomasa microbiana (Blume et al. 2002, Šantrůčková et al. 2010), y cambia la composición de la comunidad microbiana (Eilers et al. 2012).

5.2 Microorganismos en la Rizósfera

La rizósfera es un nicho ecológico único, que modula la composición y estructura de las comunidades microbianas asociadas a ella, a través de las interacciones de las plantas: exudados de la raíz, propiedades físicas y químicas del suelo, entre otros. (Mendes et al. 2013, Singh et al. 2004). Las sustancias orgánicas liberadas por las raíces sostienen la actividad metabólica de la biomasa microbiana; por lo tanto las comunidades microbianas en íntima asociación con las raíces son más activas, abundantes y diversas en comparación con microorganismos que se encuentran en el suelo desnudo. Además, los microorganismos rizosféricos controlan importantes procesos en ciclos biogeoquímicos básicamente en el desarrollo en las plantas y las protegen de microorganismos patógenos (Mendes et al. 2013, Marschner et al. 2004).

5.3 Comunidades Microbianas en Suelos Agrícolas

5.3.1 Sistemas de Manejo Orgánico y Convencional.

La demanda mundial de alimentos sigue en aumento, lo cual supone un desafío para mantener la fertilidad y la sostenibilidad del suelo (Figuerola et al. 2012). Sin embargo, las actividades antropogénicas en las tierras agrícolas causan alteraciones importantes en las características físicas, químicas y biológicas del suelo, afectando su productividad (Jangid et al. 2008). Las prácticas agrícolas no sostenibles han demostrado ser inadecuadas en muchos casos, causando considerables reducciones en la calidad del suelo (García et al. 2013).



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Las comunidades microbianas del suelo, son indicadores muy sensibles y rápidos de perturbaciones y cambios en el uso de la tierra; de este modo, una descripción cuantitativa de la estructura y diversidad de las comunidades microbianas, es de gran interés como una herramienta fundamental para evaluar la calidad del suelo (Zelles 1999, Zornoza et al. 2009).

La biota del suelo desempeña considerables funciones, teniendo efectos directos e indirectos en la calidad de los cultivos, ciclo de nutrientes y la sostenibilidad del suelo (Estrade et al. 2010). Además contribuye sustancialmente a la resistencia del agro ecosistema a la perturbación abiótica y al estrés (Brussaard et al. 2007).

Higa y Wididana (1991), mencionan que la mayoría de los suelos con un alto contenido de materia orgánica generalmente están colonizados por comunidades numerosas de microorganismos, tanto benéficos como dañinos. No obstante, el excesivo e incorrecto uso de pesticidas y fertilizantes sintéticos característicos de la agricultura convencional han afectado la microbiota del suelo, alterando significativamente sus características (Perez y Landeros 2009). Por las razones anteriormente mencionadas, se ha visto a la agricultura orgánica como una posible alternativa a la agricultura convencional de manera sostenible y sustentable (Higa y Parr 1994).

5.3.2 Estudios Relacionados

Gupta et al. (2014), indican que existe una relación directa entre la rizósfera del cultivo de cacao y *Pseudomonas putida*, una bacteria del suelo gram-negativa con capacidad para degradar compuestos aromáticos y heterocíclicos, tales como la nicotina, benzoato, y fenilalanina. Así, afirman que un gran número de genes se relacionan con el metabolismo de carbohidratos, la respuesta al estrés, la motilidad y la quimiotaxis y el metabolismo de compuestos aromáticos que ayuda en el crecimiento de las plantas de cacao.

En un estudio reciente, Caldwell et al. (2015) mencionan que en la agricultura intensiva, ecológica y de transición, el suelo de la rizósfera asociado con las plantas de café, contiene un grupo muy diverso de procariotas y miles de especies a nivel de OTU. Sin embargo, Orr et al. (2012) indican que el manejo de la fertilidad parece tener poco impacto sobre las comunidades bacterianas diazotróficas y totales.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Por otro lado, las comunidades de bacterias del suelo varían según la estación climática en la que se encuentren, presentando cambios en su composición y diversidad (Bevivino et al. 2014).

5.4 Herramientas Moleculares para el Estudio de la Biodiversidad del Suelo

Actualmente, se cree que solo el 1% de la diversidad microbiana se ha revelado, ya que no todos los microorganismos presentes en la naturaleza son cultivables mediante técnicas clásicas. De hecho, según algunos autores la diversidad genética y el potencial biotecnológico de la mayoría de los microorganismos no se revelan mediante enfoques microbiológicos convencionales (Bürgmann et al. 2001).

Los métodos moleculares pueden obviar la necesidad de cultivo celular, y por lo tanto capturar la información genética de la comunidad microbiana total (Cottrell et al. 2005). Dado que los factores abióticos y bióticos de cada hábitat varían espacial y temporalmente, se necesita un método molecular de extracción de ADN que sea ampliamente aplicable y, sin embargo, estandarizado para permitir comparaciones relativas.

Las técnicas moleculares son cuantitativamente fiables y se reduce el tiempo para caracterizar las comunidades microbianas del suelo (Hussey et al. 1972). El método molecular más común para el análisis de las comunidades microbianas está basado en el estudio de los genes ribosomales 16S rRNA para bacterias y la región ITS para hongos (Tringe y Hugenholtz 2008). Estos marcadores moleculares constituyen el blanco más adecuado para el diseño de cebadores para el estudio de la diversidad, mediante amplificación por PCR (del inglés Polymerase Chain Reaction), ya que estos genes están presentes en los microorganismos, y son útiles para la clasificación taxonómica (Suárez 2010). El estudio consiste en la extracción de ADN metagenómico directamente del suelo (Castillo et al. 2016), el cual se usa como molde para la amplificación, por PCR de los genes ribosomales existentes en la muestra (González y Fierro 2009). No obstante, éstas técnicas pueden incluir algunos sesgos a nivel de la extracción de ADN y la amplificación por PCR debido, por ejemplo, a la formación de quimeras y la amplificación inespecífica de otras regiones “blanco” del genoma de los microorganismos (Wintzingerode et al. 1997).



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Por otro lado, los métodos basados en la secuenciación de alto rendimiento son ampliamente utilizados hoy en día para estudiar las comunidades microbianas. Aunque estos enfoques son superiores a los métodos tradicionales, pueden introducir sesgos durante sus fases experimentales y de análisis bioinformático (Lazarevic et al. 2013).

La Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (DGGE, por sus siglas en inglés) es una técnica rápida y sencilla que proporciona información relativamente precisa sobre la estructura, riqueza y diversidad de las comunidades microbianas que colonizan los suelos y es útil para seguir la evolución espacial y temporal de dichas comunidades y su respuesta a cambios físico-químicos y nutricionales (Cornejo et al 2014).

Mediante esta técnica se pueden determinar los índices de diversidad, como riqueza y abundancia de comunidades microbianas, entendidos como el número de especies presentes y el número de individuos que representan a cada especie respectivamente (González 2012).

La técnica de DGGE se basa en la separación electroforética de moléculas de ADN del mismo tamaño pero con diferente secuencia de nucleótidos. Esta separación depende de las diferencias en la composición de nucleótidos, y de la concentración de los agentes desnaturalizantes (urea y formamida) presentes en los geles de poliacrilamida, la cual influye en la temperatura de fusión de los fragmentos de ADN (Ferris et al. 1996). De esta forma, las moléculas se desnaturalizan total o parcialmente disminuyendo su velocidad de migración en el gel, resultando la aparición de diferentes bandas (Kisand et al. 2005). Cada una de estas bandas, corresponde a una unidad taxonómica operativa (OTU), que potencialmente representa a una población microbiana diferente (= especie) presente en la comunidad (Shannon et al. 2002).

Sin embargo la técnica de DGGE también presenta desventajas ya que solamente puede detectar poblaciones que representen al menos el 1% del total de células presentes en una comunidad, es decir solo las especies dominantes (Muyzer 1999).

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Sitios de Muestreo y Recolección de Muestras

Se seleccionaron 6 pares de sitios de muestreo correspondientes a campos de cultivos de cacao y café, siendo 3 pares bajo manejo orgánico y 3 pares bajo manejo convencional respectivamente. Cada par de cultivos fueron ubicados lo más cercano uno del otro para minimizar variaciones ambientales y edáficas. Los sitios estuvieron distribuidos entre las provincias de Azuay y Guayas como se indica en la Figura 1. En cada sitio de muestreo, se seleccionó una planta al azar, tomándose 100 g de suelo de la zona radicular del cultivo. Las muestras fueron transportadas en hielo hasta llegar al laboratorio, dónde se las almacenó a -20 °C hasta su uso.

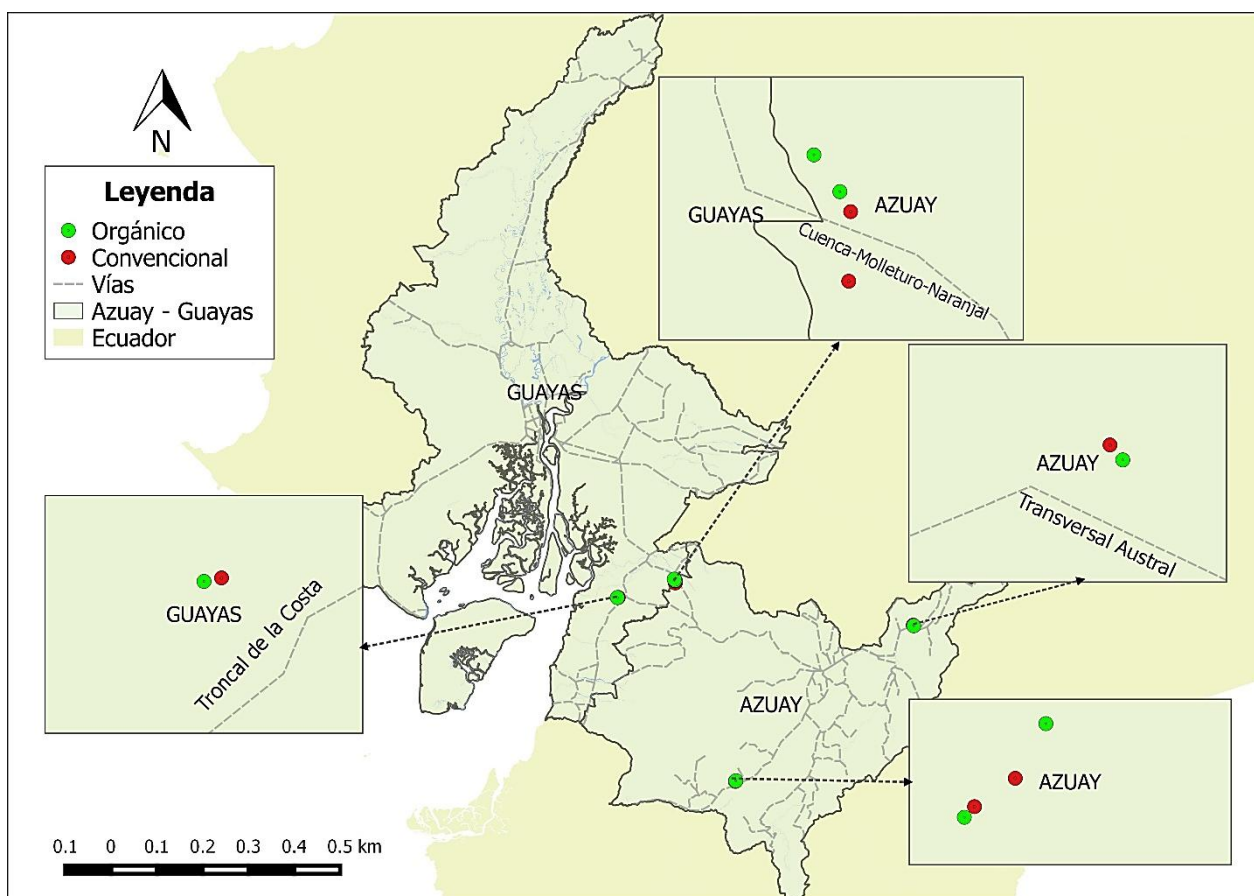


Figura 1 Localización de los sitios de muestreo.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

6.2 Análisis Molecular

6.2.1 Extracción de ADN Metagenómico

El ADN metagenómico de las muestras colectadas fue extraído usando el kit de extracción de ADN de suelos Powersoil® DNA isolation kit (Mobio, Carlsbad, CA, EE.UU) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se verificó la calidad de la extracción de ADN metagenómico mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con amortiguador TAE 1X. Además, para cargar el gel se utilizó 1 µl de SYBER GREEN™, 1 µl de Blue Juice™ 10X y 5µl de ADN metagenómico. El ambiente de separación fue en 90 voltios por 30 minutos; seguidamente, se procedió a visualizar el ADN metagenómico extraído y purificado en un foto documentador (E-Gel® Imager System, Invitrogen) y por último se almacenaron las muestras de ADN metagenómico a -4 °C hasta su uso.

6.2.2 PCR (Polymerase Chain Reaction)

Para el análisis de diversidad bacteriana y fúngica por DGGE, el ADN metagenómico fue amplificado por PCR utilizando cebadores universales que amplifican regiones correspondientes a los genes ribosomales: 16S (en el caso de bacterias) e ITS (en el caso de hongos). El gen ADNr 16S, se amplificó con los cebadores F968 (5'-GC-CGC CCG CGC CCC GCG CCC GGC CGC CCC CGC CCC AAC GCG AAG AAC CTT AC) y 1401R (5'-CGGTGTGTACAAGACCC-3). La región ITS del genoma de hongos se amplificó en dos etapas de PCR (PCR anidada). En la primera etapa, se utilizaron los cebadores: ITS1F (5'-CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A-3') y ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') y para la segunda etapa ITS1FGC (5' - CGC CCG CGC GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCT TGG TCA TTT AGA GGA AGT AA -3') e ITS2 (5' - GCT GCG TTC ATC GAT GC-3'). Para la amplificación por PCR se utilizó una premezcla (Platinum PCR Supermix, Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante usando un volumen de reacción de 25 µl. Las condiciones de amplificación se muestran en la Tabla 1.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Tabla 1: Fases térmicas tiempo y ciclos de PCRs en 16 S, ITS e ITS anidada.

Periodos	Fase	Temperatura °C	Tiempo "	Ciclos	Regiones
Desnaturalización	Inicial	16	240		
Desnaturalización	-	94	45	30	16S
Hibridación	-	55	75		Wu et al.
Polimerización	-	72	60		(2013)
Extensión	Final	72	300		
Desnaturalización	Inicial	94	300		
Desnaturalización	-	94	30	10	
		dismin.1°C/ciclo			
Hibridación	-	65	30		ITS
Polimerización	-	72	30		Liu et al.
Polimerización	-	94	30	25	(2015)
Polimerización	-	55	30		
Polimerización	-	72	30		
Extensión	Final	72	420		
Desnaturalización	Inicial	94	240		
Desnaturalización	-	94	45	30	ITS
Hibridación	-	55	75		ANIDADA
Polimerización	-	72	60		Wu et al.
Extensión	Final	72	300		(2013)

6.2.2.1 PCR Bacterias (gen ADNr 16S)

El ADN metagenómico extraído se utilizó para la amplificación por PCR al gen ADNr 16S que codifica la región variable V6 y V8 que mide aproximadamente 1400 pb. Para su amplificación se utilizó el kit comercial Platinum® PCR SuperMix para un volumen de 50 µl (Tabla 2).



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Tabla 2: Concentración y volumen para PCR de gen 16S - 50 μ l.

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN
Platinum® PCR SuperMix	1x
Primers F968GC	0.2 μ M
Primers 1401R	0.2 μ M
Agua Ultra pura	-
ADN metagenómico	< 500 ng

6.2.2.2 PCR Hongos (Región ITS)

También se utilizó el ADN metagenómico aislado para la amplificación de la región ITS en hongos mediante Touchdown PCR. Se utilizaron cebadores antes mencionados que amplifican una región de aproximadamente 1400pb. Las concentraciones y volúmenes a añadir por cada reacción de 20 μ l (Tabla 3).

Tabla 3: Concentración y volumen para PCR región ITS- 20 μ l.

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN
Buffer	1x
MgCl ₂	2.5 mM
dNTPs	0.5 mM
Primers ITS1F	0.2 μ M
Primers ITS4	0.2 μ M
Taq_polimerasa	1U
Agua Ultrapura	-
ADN	1

A partir del producto de la primera amplificación se realizó un segundo PCR (PCR anidado) utilizando los cebadores ITS2 e ITS1FGC, descritos anteriormente. El volumen final para cada reacción fue de 50 μ l (Tabla 4).



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Tabla 4: Concentración y volumen - PCR región ITS anidada-50 μ l

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN
Buffer	1x
MgCl ₂	2.5 mM
dNTPs	0.5 mM
Primers ITS1FGC	0.2 μ M
Primers ITS2	0.2 μ M
Taq_polimerasa	1U
Agua Ultra pura	100 μ l
ADN de 1 ^{ra} PCR	1 μ l

Los productos de amplificación por PCR del gen ADNr 16S y la región ITS, fueron verificados para su longitud y especificidad mediante empleo de electroforesis en geles de agarosa al 1% con buffer TAE 1X. Para cargar los carriles del gel se utilizó 1 μ l de SYBER GREEN, 1 μ l de Blue Juice 10X y 5 μ l de ADN metagenómico. El ambiente de separación fue de 90 voltios por 30 minutos, por último se foto documentó los geles mediante el uso de un transiluminador E-Gel® Imager System. Figura 3, figura 4 y Figura 5, respectivamente.

6.2.3 Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (DGGE)

Los productos amplificados de la región ITS fueron sometidos a electroforesis en gel de poliacrilamida con gradiente desnaturalizante, usando un protocolo previamente optimizado, con un gradiente desnaturalizante de 20-35% de urea y formamida con una concentración de acrilamida al 8%. De forma similar, los productos amplificados de la región 16S, también fueron sometidos a electroforesis en gel de poliacrilamida con gradiente desnaturalizante 35-55% al 7% de acrilamida. Para la corrida electroforética en ambos casos se preparó y ensambló el equipo DCode™ Universal Mutation Detection System (Bio-Rad), siguiendo las instrucciones descritas por (Zwart y Bok 2004).

Preparado el equipo, se procedió a cargar en el gel las muestras de ADN amplificado con sus respectivos marcadores; para esto se hizo una mezcla de 3 μ l de Bluejuice 6X con 15 μ l de ADN en un tubo de microcentrífuga de 1,5ml. Para la corrida electroforética se inició con 15 minutos a 60 °C con 100 voltios, seguido



UNIVERSIDAD DE CUENCA

de esto se continuó en un ambiente con 60 °C a 80 voltios por 14 horas. Terminada la corrida electroforética, los geles fueron teñidos utilizando SYBER Green 2x en tampón TAE 0.5X durante 30 minutos, a temperatura ambiente y en la oscuridad. Finalmente se visualizó las imágenes con un foto-documentador y transiluminador Molecular Imager® Gel Doc™XR.

Luego de la electroforesis, los geles fueron digitalizados para su análisis. A partir de las imágenes obtenidas, se determinaron índices de diversidad de unidades taxonómicas operacionales (OTUs): riqueza, abundancia relativa e índice de Shannon, empleando los programas PyElph y GelAnalyzer.

A partir de los resultados de los sitios muestreados se compararon las estructuras de las comunidades bacterianas y fúngicas de suelos orgánicos con suelos convencionales, usando un análisis jerárquico.

6.2.4 Índices de Diversidad

Se determinaron los índices de diversidad en función de la riqueza de especies (S) la misma se detalla como el número de diferentes organismos presentes en una determinada muestra (número de bandas en DGGE) es decir, $S = N^{\circ}$ de bandas detectadas. Además, está en función del Índice de Shannon, la misma que se calcula en base a las bandas de los perfiles obtenidos en DGGE, tomando el número y la intensidad relativa de las bandas en una línea individual, es decir, $H' = -\sum P_i \ln P_i$, donde P_i es la intensidad relativa de las bandas en un perfil.

Finalmente toma en cuenta la equitabilidad, esta medida expresa qué tan similar es la abundancia de diferentes especies. Se calcula a partir del índice de riqueza de especies (S) y el índice de Shannon (H) según la siguiente ecuación: $E = H / \ln (S)$ (Cedeño 2005).

6.2.5 Comparación de las Comunidades Microbianas

Las semejanzas y/o diferencias de los perfiles genéticos se analizaron en el software PyElph, del cual se obtuvo los dendogramas de agrupamiento jerárquico de enlaces promedio no ponderado, tanto para hongos como para bacterias con los diferentes formatos de clasificación jerárquica UPGMA, WPGMA, SINGLE LINKAGE, COMPLETE LINKAGE y NEIGHBOR JOINING.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

6.3 Determinación de las Propiedades físico-químicas de los Suelos.

Para determinar las propiedades físico-químico de los suelos, se tomó una muestra de suelo por planta, usando un cilindro de acero de volumen conocido en los primeros 10 cm de suelo en la zona rizosférica de la planta; Estas muestras fueron posteriormente trasladadas al laboratorio de suelos de la Universidad de Cuenca donde se determinó su textura, estructura, densidad aparente, densidad real, pH, conductividad eléctrica, porosidad, % de materia orgánica, carbono orgánico y la capacidad de retención de humedad de acuerdo a los métodos que se indican en la Tabla 5.

Tabla 5: Metodología empleada en los análisis físicos de los suelos

Variable	Método	Fuente
Textura	Hidrómetro de Bouyoucos	Promas - Universidad de Cuenca (s.f.)
Estructura	Morfológico	FAO (2009)
Densidad aparente m ³ g ⁻³	Cilindro	FAO (2009)
Densidad real	Picnómetro	García et al. (2009)
pH	Potenciómetro	Torres et al. (2001)
Conductividad eléctrica	Dilución	Torres et al. (2001)
Porosidad %	Ecuación	Silva et al. (2000)
Materia Orgánica %	Ignición	Schumacher (2002)
Carbono orgánico	Ecuación	Schumacher (2002)
Capacidad de Retención de Humedad %	Saturación	Silva et al. (2000)



UNIVERSIDAD DE CUENCA

6.4 Análisis Estadístico

El análisis estadístico tanto de la composición y diversidad de las comunidades microbianas como las propiedades físico-químicas del suelo, se realizaron utilizando el software IBM SPSS Statistics 22.0 mediante la prueba paramétrica de t de student (t) con un valor de $p \leq 0,05$, para obtener valores significativos o no de los datos.



7. RESULTADOS

7.1 Resultados en Análisis Molecular

7.1.1 Extracción de ADN Metagenómico

Se obtuvo ADN metagenómico en cantidad y calidad adecuada para su amplificación y posterior análisis por DGGE. En la figura 2 se observa claramente la presencia de las bandas del ADN metagenómico sin fragmentación, extraído de las 12 muestras de suelo. Además, se muestra el ADN metagenómico del control positivo y la ausencia de contaminación con ADN en el control negativo.

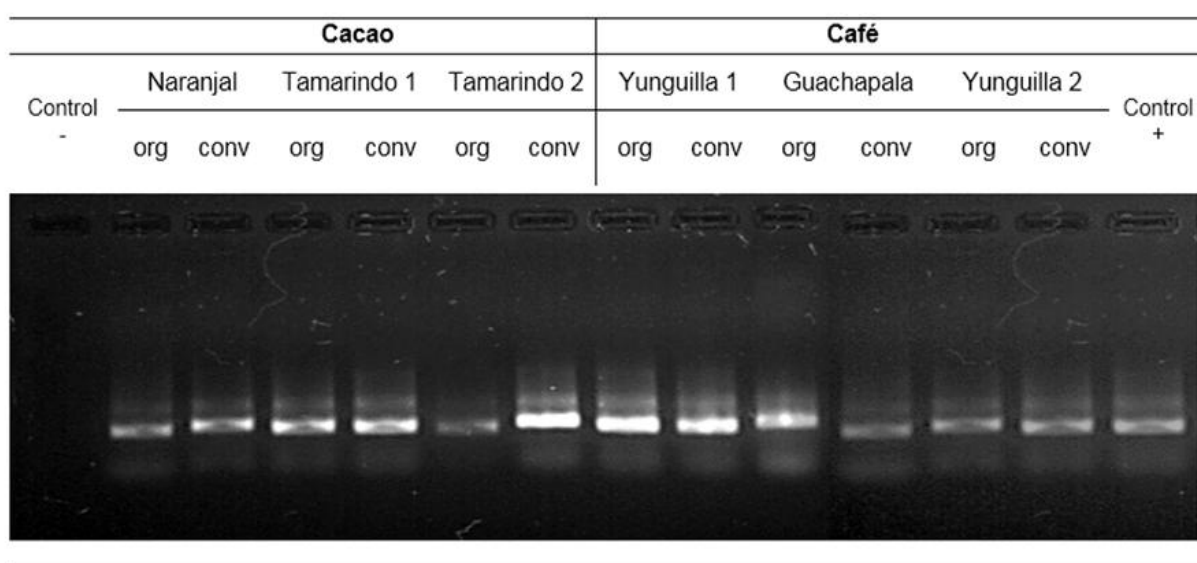


Figura 2: Bandas de ADN metagenómico.

7.1.2 Amplificación – PCR

El ADN fue amplificado por PCR utilizando cebadores universales indicados anteriormente, obteniéndose fragmentos de la longitud esperada tanto para las amplificaciones de la región 16S de bacterias con aproximadamente (700pb) (figura 3) como también (250pb) de la región ITS de hongos (figura 5).

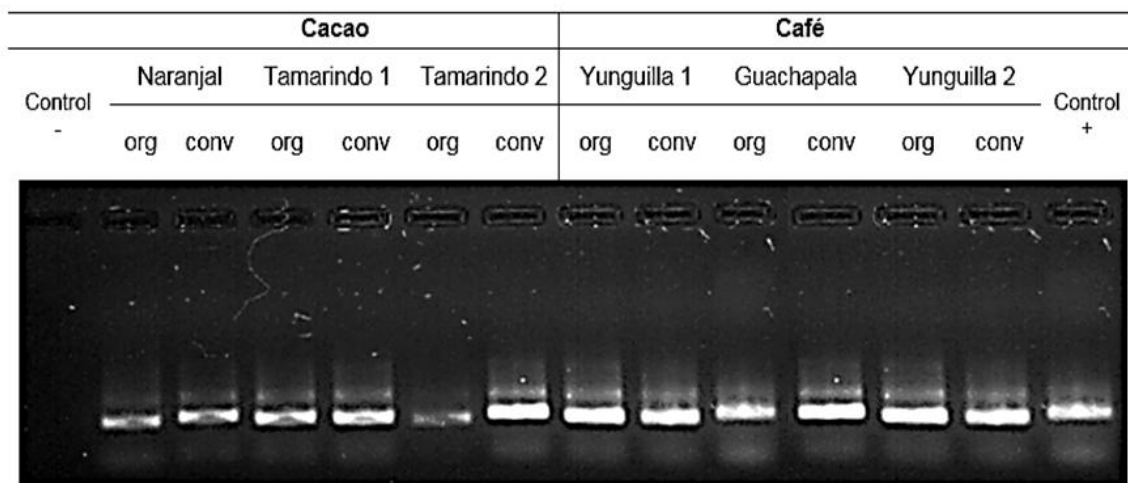


Figura 3: Productos de amplificación por PCR de la región 16S (bacterias) en gel de agarosa 1% (w/v).

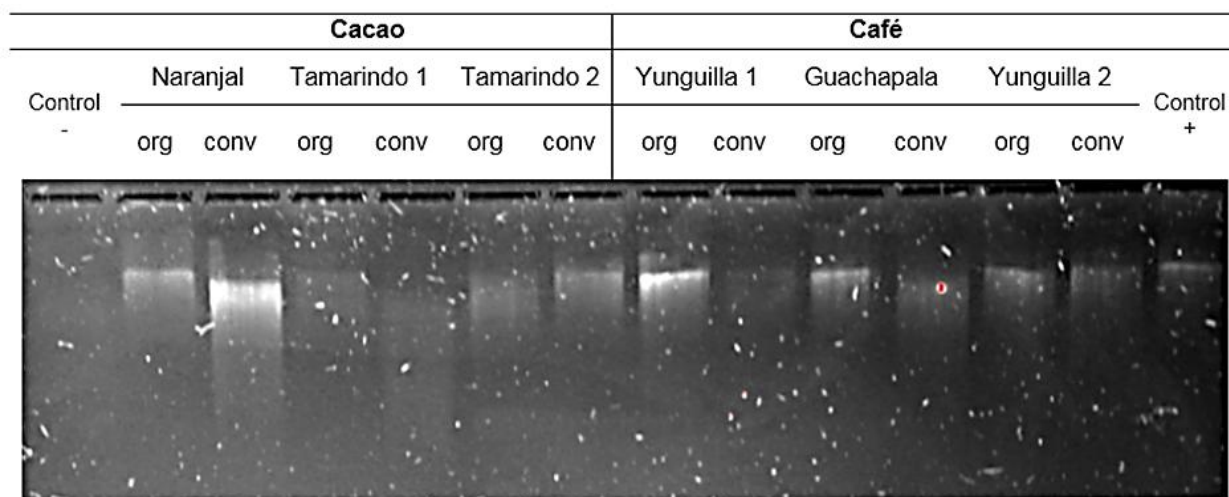


Figura 4: Productos de la primera amplificación por PCR de la región ITS en gel de agarosa 1% (w/v).

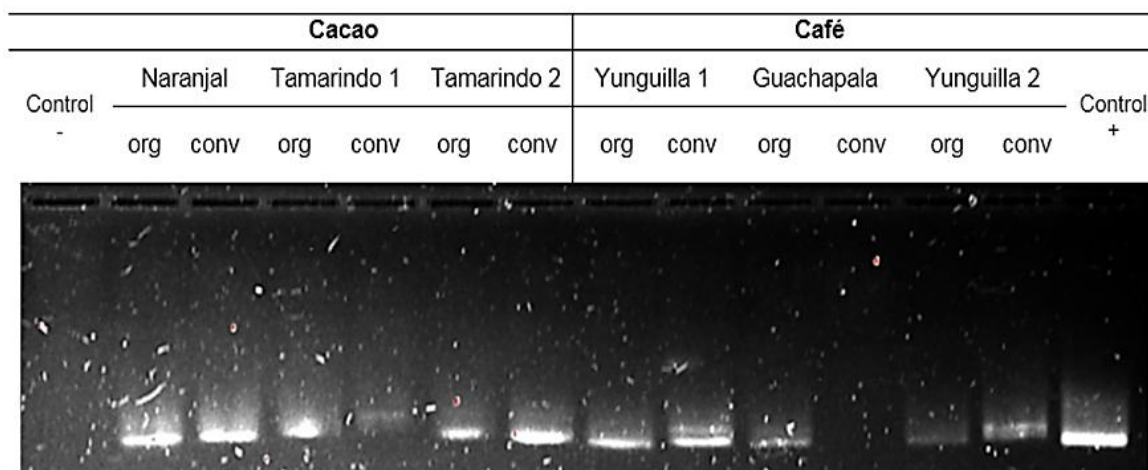


Figura 5: productos de la segunda amplificación por PCR de la región ITS en gel de agarosa 1% (w/v).

En los productos de amplificación de la región ITS se visualiza que en la muestra de café-convencional-Guachapala no existe amplificación, de este modo se procedió a realizar una segunda PCR con esta muestra para poder confirmar su amplificación.

7.1.3 Gel con Gradiente Desnaturalizante

El perfil de diversidad en bacterias con gradiente desnaturalizante 35-55% (urea y formamida) al 7% de acrilamida fueron claramente observadas en todos los pocillos, obteniéndose bandas definidas, de alta intensidad y buena distribución en el gel. Algunas bandas están presentes en todas las muestras analizadas, mientras que otras solo están en una (o pocas) muestras. Por otra parte, se destaca la presencia de bandas muy intensas, mientras que otras son mucho más tenues (Figura 6). Esta imagen fue analizada en los softwares PyElph y GelAnalyzer calculando su diversidad, riqueza e índices de equitatividad (Tabla 6).



UNIVERSIDAD DE CUENCA

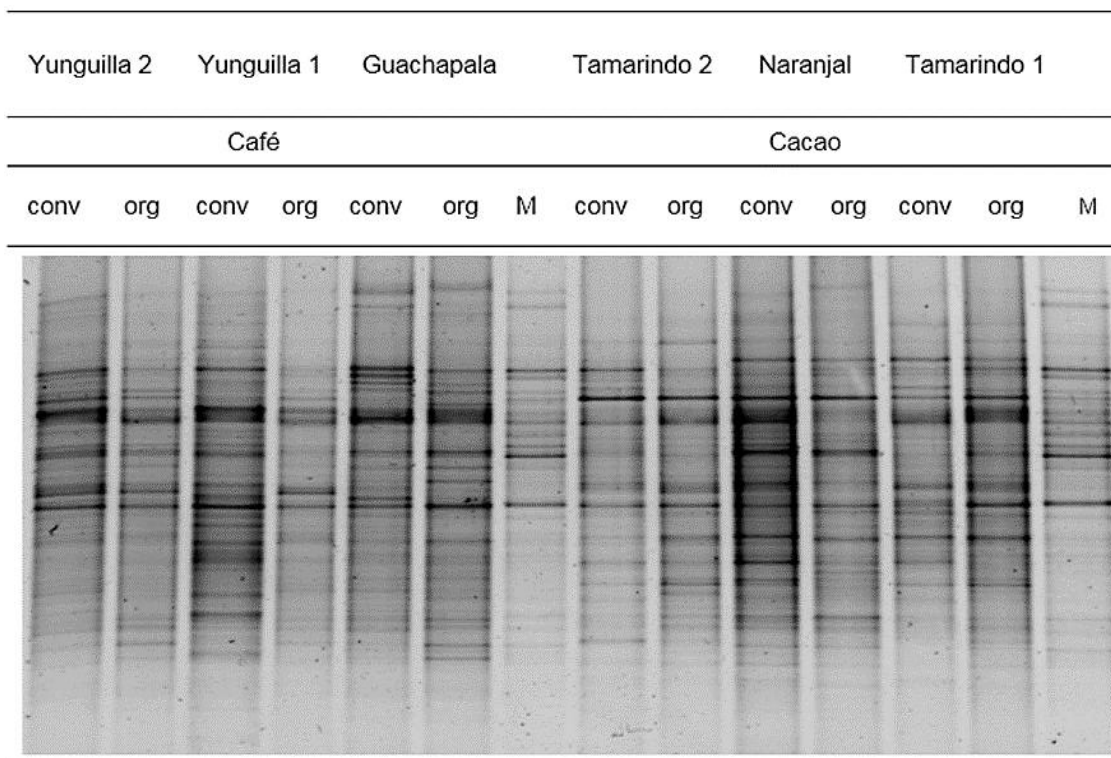


Figura 6: Perfil de diversidad del gen 16S ADNr, con gradiente desnaturalizante 35-55%.

org= orgánico **conv**= convencional **M**= marcador

En el perfil de diversidad en hongos con gradiente desnaturalizante 20-35% (urea y formamida) al 8% de acrilamida, se obtuvo una visualización clara de los perfiles en casi todos los carriles del gel, excepto en la muestra de café orgánico Yunguilla 2, esta ausencia de bandas se le atribuye a un error humano; por esta razón, se le excluye del análisis posterior sugerido. Con las muestras con presencia de bandas definidas, se observa alta intensidad y buena distribución en los carriles del gel. Al igual que en el otro gel, algunas bandas están presentes en todas las muestras analizadas, mientras que otras solo están presentes en una (o pocas) muestras. Por otra parte, se destaca la presencia de bandas muy intensas, mientras que otras son mucho más tenues. Esta imagen fue analizada en los softwares PyElph y GelAnalyzer calculando su diversidad, riqueza e índices de equitatividad (Tabla 7).



UNIVERSIDAD DE CUENCA

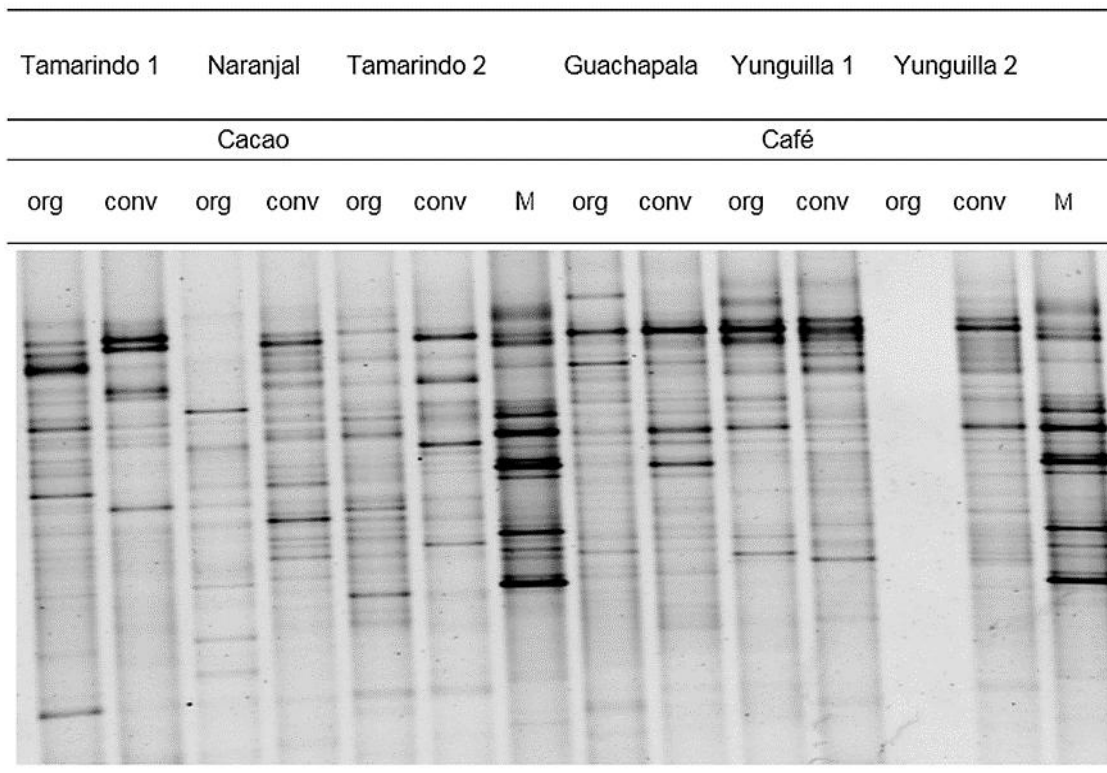


Figura 7: Perfil de diversidad de la región ITS (hongos) con gradiente desnaturalizante 20-35%

7.2 Índices de Diversidad

Se realizó el análisis estadístico para determinar los índices de diversidad (riqueza, Shannon y equitabilidad) de las comunidades microbianas que habitan en suelos de los cultivos de cacao y café bajo sistemas de manejo orgánico y convencional, mediante la prueba *t* determinando si existen diferencias significativas en las medias para diversidad de acuerdo al manejo orgánico y convencional, con un nivel de significancia de 0.05.

En cuanto a la riqueza (S) de especies de bacterias, se obtuvo un valor medio de 11.17 ± 1.08 para el manejo convencional y 9.83 ± 0.95 para el manejo orgánico; de los cuales, en 4 pares de 6 pares totales la riqueza fue mayor en los cultivos convencionales y en los 2 pares restantes la riqueza fue mayor en los cultivos orgánicos (Tabla 6). En cuanto a los valores medios de Shannon (H), oscilaron entre 2.30 ± 0.10 para cultivos convencionales y 2.21 ± 0.10 para cultivos orgánicos. Para los valores de equitabilidad fue de 0.97 ± 0.01 para los cultivos convencionales y 0.98 ± 0.01 para los cultivos de manejo orgánico; resultando no ser



UNIVERSIDAD DE CUENCA

significativamente diferentes en índices de Shannon y equitabilidad en los dos sistemas de manejo (Tabla 6).

De acuerdo a los valores obtenidos en la prueba paramétrica de t , se determina que los índices de riqueza ($p = 0.374$), Shannon (H) ($p = 0.504$) y equitabilidad ($p = 0.233$) de la región 16S (bacterias) no son significativamente diferentes en los dos sistemas de manejo (Tabla 6).

Además, se analizó en Bacterias los valores de riqueza (S), con una media de 12.33 ± 1.12 para el manejo convencional y 11.00 ± 1.26 para el manejo orgánico, observándose que, 3 pares tienen mayor riqueza en cultivos convencionales, 1 par tuvo valores iguales y en 1 par fue mayor la riqueza en los cultivos de manejo orgánico (Tabla 7). Los valores de Shannon (H), fueron de 2.41 ± 0.13 y 2.32 ± 0.13 para cultivos convencionales y orgánicos, respectivamente. El índice de equitabilidad fue de 0.97 ± 0.01 para el manejo convencional y 0.98 ± 0.01 para el manejo orgánico (Tabla 7).

Los índices de diversidad en riqueza ($p = 0.448$), Shannon ($p = 0.632$) y Equitabilidad ($p = 0.685$) de los perfiles de diversidad de la región ITS, tampoco mostraron diferencias estadísticamente significativas.

Con la información obtenida en el análisis de diversidad este estudio, se observa que no existen diferencias estadísticamente significativas.

Existe diferencia entre los valores numéricos y las medias obtenidas en los índices de diversidad, sin embargo, no son relevantes para afirmar con significancia estadística, que el manejo orgánico posee mayor o menor diversidad de hongos y bacterias en comparación al manejo convencional.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Tabla 6: Índices de Diversidad en Bacterias (16S) Riqueza (S), Índice de Shannon (H) e Índices de Equitabilidad de Shannon (EH).

BACTERIAS (16S)										
Manejo		Tamarindo1	Naranjal	Tamarindo2	Guachapala	Yunguilla1	Yunguilla2	\bar{x}	SE	valor p
orgánico convencional	S	11.00	14.00	11.00	10.00	14.00	7.00	11.17	1.08	S 0.37
	H	2.36	2.44	2.33	2.20	2.58	1.90	2.30	0.10	
	EH	0.98	0.93	0.97	0.95	0.98	0.98	0.97	0.01	
										H 0.50
	S	9.00	11.00	10.00	13.00	6.00	10.00	9.83	0.95	
	H	2.15	2.34	2.24	2.48	1.77	2.26	2.21	0.10	
	EH	0.98	0.98	0.97	0.97	0.98	0.98	0.98	0.01	EH 0.23

Tabla 7: Índices de Diversidad en Hongos (ITS) Riqueza (S), Índice de Shannon (H) e Índices de Equitabilidad de Shannon (EH).

HONGOS (ITS)										
Manejo		Tamarindo1	Naranjal	Tamarindo2	Guachapala	Yunguilla1	Yunguilla2	\bar{x}	SE	valor p
orgánico convencional	S	7.00	13.00	13.00	15.00	13.00	13.00	12.33	1.12	S 0.45
	H	1.75	2.54	2.54	2.60	2.53	2.52	2.41	0.13	
	EH	0.90	0.99	0.99	0.96	0.99	0.98	0.97	0.01	
										H 0.63
	S	14.00	8.00	13.00	12.00	8.00	..	11.00	1.26	
	H	2.58	2.07	2.55	2.45	1.95	..	2.32	0.13	
EH	0.97	0.99	0.99	0.99	0.94	..	0.98	0.01	EH 0.69	

7.3 Índices de Composición

El análisis de composición en los cultivos de cacao y café bajo los dos sistemas de manejo, se reveló mediante los métodos de clasificación jerárquica del software PyElph 1.4 tales como UPGMA, WPGMA, SINGLE LINKAGE, COMPLETE LINKAGE y NEIGHBOR JOINING, observándose agrupamientos no definidos de las comunidades microbianas del suelo, es decir, no se asociaron dependiendo del manejo, si no independientemente de estos (Figuras 8 y 9).



UNIVERSIDAD DE CUENCA

7.3.1 Dendogramas de Agrupamiento: 16 S – ITS

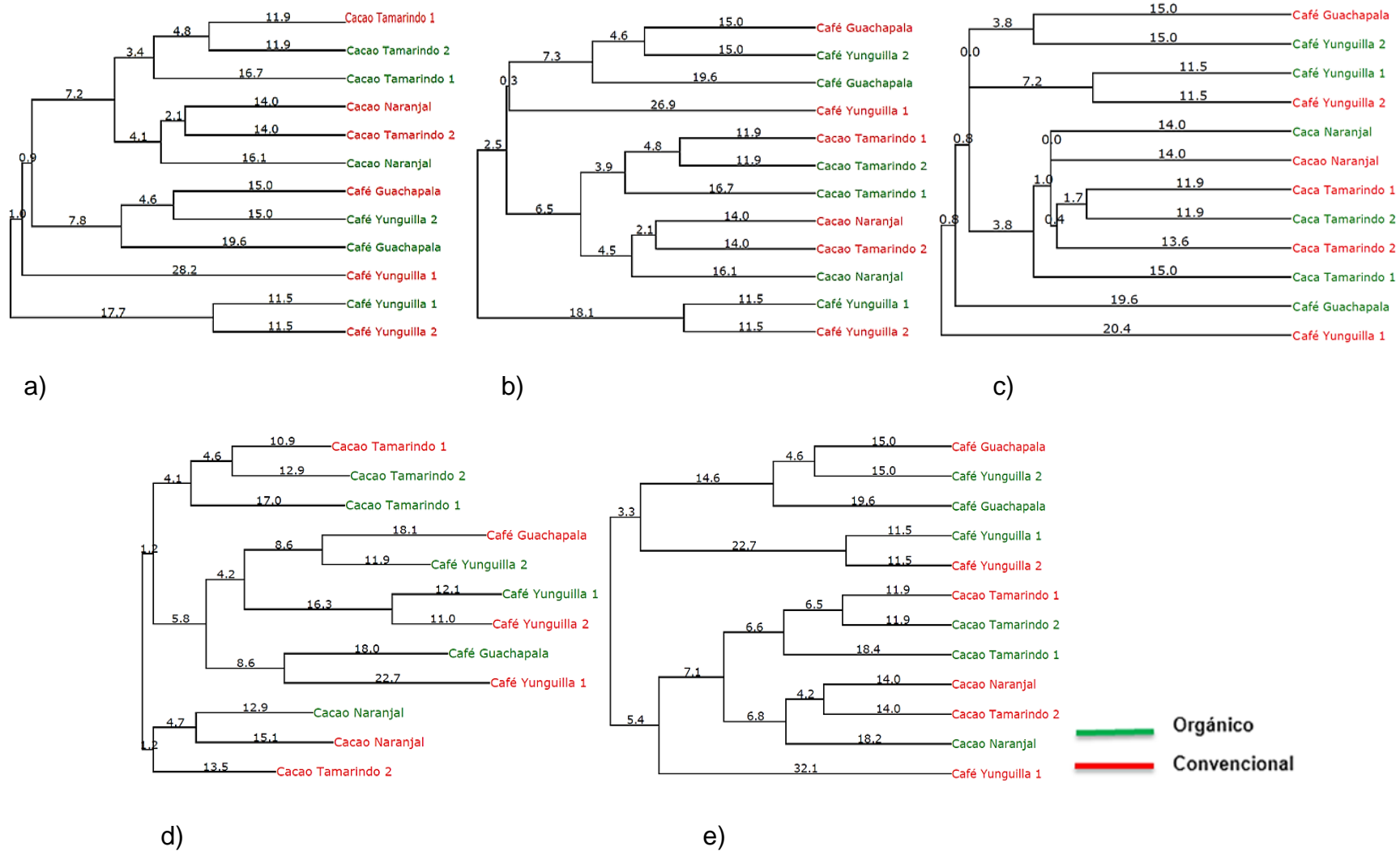


Figura 8: Dendogramas de bacterias (16S) a) UPGMA b) WPGMA c) Single Linkage d) Neighbour Joining e) Complete Linkage.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

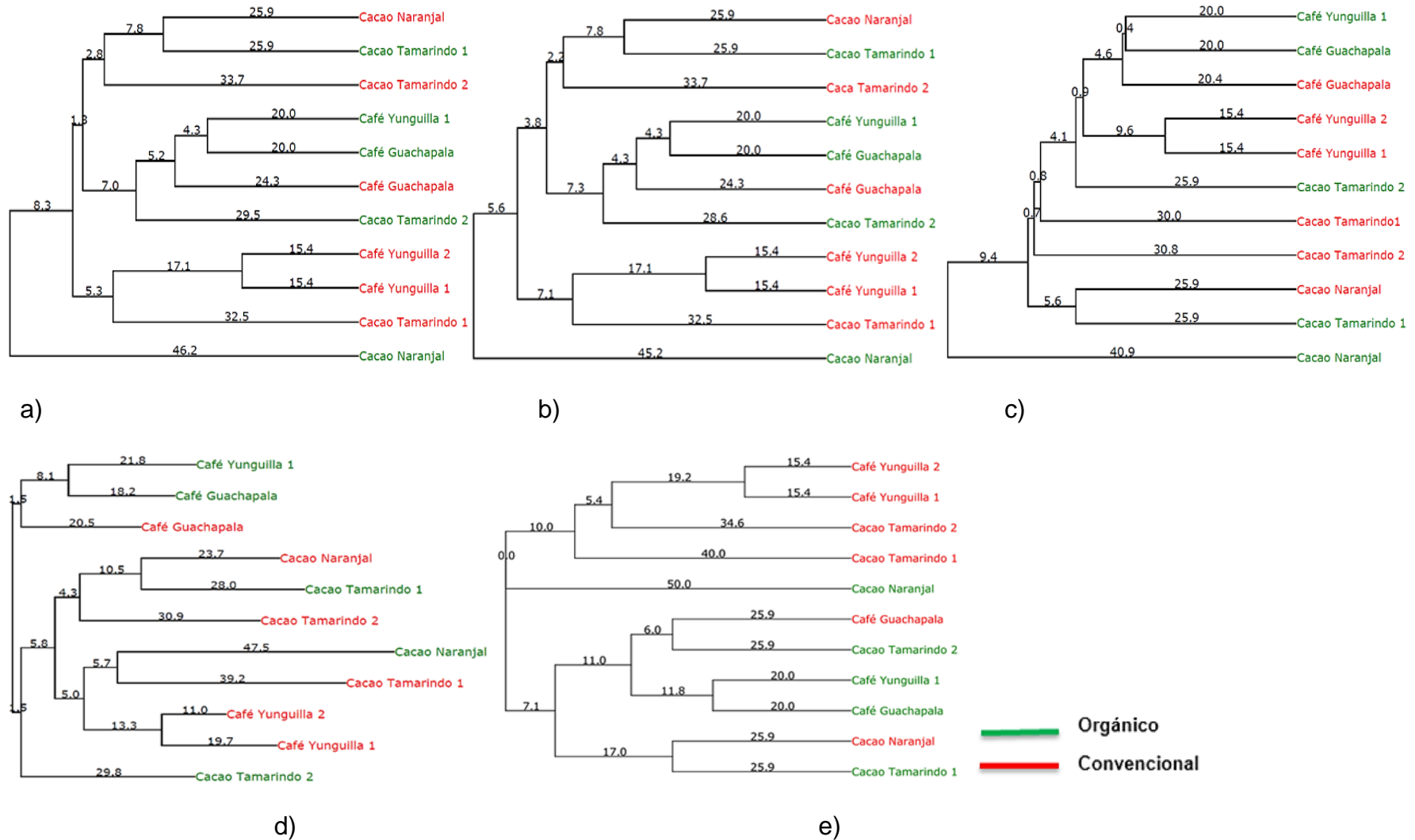


Figura 9: Dendrogramas en hongos (ITS) a) UPGMA b) WPGMA c) Single Linkage d) Neighbour Joining e) Complete Linkage.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

7.4 Análisis Físicos de los suelos

En los análisis físico-químicos de los suelos de los cultivos de cacao y café bajo los dos sistemas de manejo, tampoco presentaron diferencias estadísticamente significativas, de este modo se reportan los valores medios del pH con 6.05 ± 0.23 para el manejo convencional y 6.40 ± 0.12 para el manejo orgánico. En la conductividad eléctrica se obtuvieron valores medios de 0.12 ± 0.01 tanto para el manejo orgánico y convencional. Para la densidad aparente se obtuvieron valores medios de 1.23 ± 0.04 para convencional y 1.18 ± 0.07 para el manejo orgánico y para la densidad real; 2.31 ± 0.05 para el convencional y 2.01 ± 0.05 para el orgánico.

En el porcentaje de la materia orgánica (MO%) se determinó valores para las medias de 7.85 ± 0.81 para el convencional y 9.80 ± 0.96 para el manejo orgánico, observándose la existencia de valores altos de materia orgánica en los dos sistemas de manejo de suelos.

Además, se obtuvieron valores medios para el carbono orgánico, teniendo 5.35 ± 1.23 para en manejo convencional y 6.31 ± 0.76 para el manejo orgánico. De la misma forma para la capacidad de retención de humedad de los suelos se obtuvieron valores medios de 48.50 ± 1.31 para el convencional y 51.66 ± 2.60 para el convencional. Para el porcentaje de la porosidad se determinaron valores medios para el manejo convencional y orgánico de 48.72 ± 1.25 y 51.51 ± 2.53 respectivamente (Tabla 8).

En la textura de los suelos 4 de 6 muestras se observa la presencia del tipo Arenoso francoso y 2 de 6 de tipo franco arenoso en los suelos convencionales. En los suelos orgánicos 4 de 6 muestras se observa del tipo Franco arenoso, 1 de 6 muestras de tipo Arenoso francoso y 1 de 6 muestras de tipo arenoso. Para la estructura de los suelos en la clasificación por su forma se obtuvo de 4 de 6 de tipo Bloque y 2 de 6 de tipo bloque granular para los dos sistemas de manejo (Tabla 8).

La prueba de t muestra los valores de p estadísticamente no significativos para las variables físico-químicas en comparación con los dos manejos, obteniendo para el pH ($p = 0.22$), conductividad eléctrica: ($p = 0.88$), Densidad aparente ($p = 0.58$), % de materia orgánica ($p = 0.15$), % de carbono orgánico ($p = 0.52$), capacidad de



UNIVERSIDAD DE CUENCA

retención de humedad ($p = 0.30$), y para el %de porosidad ($p = 0.35$) excepto en la Densidad real que muestra un valor ($p = 0.01$).

Tabla 8: Análisis físico-químico en los cultivos de cacao y café en suelos bajo manejo orgánico y convencional.

Manejo	Medidas	Naranjal	Tamarindo 1	Tamarindo 2	Yunguilla 1	Guachapala	Yunguilla 2	\bar{x}	SE	valor p
Convencional	pH	5.71	5.48	6.07	5.58	6.67	6.82	6.05	± 0.23	pH
	Ce	0.09	0.11	0.15	0.15	0.14	0.13	0.12	± 0.01	0.22
	Da	1.13	1.36	1.13	1.23	1.24	1.27	1.23	± 0.04	Ce
	Dr	2.50	2.36	2.38	2.20	2.31	2.14	2.31	± 0.05	0.88
	MO %	6.70	5.80	7.80	6.90	8.50	11.40	7.85	± 0.81	Da
	C O %	3.90	3.40	4.50	4.00	4.90	11.40	5.35	± 1.23	0.58
	CRH %	52.00	44.00	52.00	46.00	48.00	49.00	48.50	± 1.31	Dr
	P %	52.07	44.60	52.30	46.33	48.58	48.47	48.72	± 1.25	0.01
	Estr.	Bq	Bq	Bq-g	Bq	Bq	Bq-g			
	Text.	A-f	A-f	A-f	A-f	F-a	F-a			
Orgánico	pH	6.34	6.49	6.60	6.82	6.00	6.15	6.40	± 0.12	MO%
	Ce	0.12	0.14	0.11	0.12	0.13	0.14	0.12	± 0.01	0.15
	Da	0.91	1.05	1.28	1.27	1.30	1.29	1.18	± 0.07	C O%
	Dr	1.86	1.94	2.13	2.00	2.21	1.94	2.01	± 0.05	0.52
	MO %	12.40	11.60	5.80	10.70	9.30	9.00	9.80	± 0.96	CRH
	C O %	7.20	6.70	3.40	6.20	5.40	9.00	6.31	± 0.76	0.30
	CRH %	62.00	54.00	45.00	53.00	51.00	45.00	51.66	± 2.60	P%
	P %	61.72	53.37	45.38	52.94	50.78	44.87	51.51	± 2.53	0.35
	Estr.	Bq	Bq	Bq-g	Bq	Bq	Bq-g			
	Text.	F-a	F-a	A	F-a	F-a	A-f			

Da. (Densidad aparente), Dr. (Densidad real), %P (Porosidad), pH (Potencial de hidrógeno) C.E (Conductividad Eléctrica), %M.O (Materia orgánica), %C.O (Carbono orgánico), %CRH (contenido de humedad) % A (Arenoso), F-a (Franco arenoso) A-f (Arenoso francoso) Bq (Bloque) Bq-g (Bloque-granulado).



8. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos no muestran valores estadísticamente significativos, ya sea en la diversidad y composición de la vida microbiana (Hongos y Bacterias) ni tampoco en las propiedades físico-químico del suelo. Se especula que no solo el tipo de manejo del suelo está directamente relacionado con la diversidad de los microorganismos, si no que existen además otras variables que no se han tomado en cuenta para la investigación.

Muchas investigaciones en el área de diversidad y composición de las comunidades microbianas, han llevado a cabo con la técnica molecular de DGGE siendo un método altamente sensible y relativamente reproducible, ya que consta de varias etapas experimentales cuyo resultado final es la obtención de un patrón de bandas que representa la *huella molecular* de la muestra analizada. Es ideal para realizar estudios preliminares de diversidad microbiana, como el antecedente para un estudio posterior más detallado. Sin embargo existen algunas limitaciones en esta técnica (Fernández y Le 1987), limitando que el número máximo de bandas de ADN que puedan separarse, es decir, puede detectar poblaciones que representen al menos el 1% del total de células presentes en una comunidad, es decir solo las especies dominantes (Muyzer et al. 1993), ocasionado por la micro heterogeneidad en las secuencias de algunos genes, como ocurre con la secuencias ribosomales (Clayton et al. 1995).

Este estudio se ha llevado a cabo mediante el uso de la herramienta molecular conocida como DGGE, para determinar la diversidad y composición de bacterias y hongos en cultivos de cacao y café bajo dos sistemas de manejo. Obteniéndose resultados con diferencias estadísticamente no significativos. Los resultados de esta investigación concuerda con los que obtuvieron (Shannon et al. 2002), los mismos que encontraron que las diferencias en las comunidades microbianas en suelos con tendencias orgánicas y convencionales, fueron leves y que en muchos de los parámetros físicos analizados no se encontraron diferencias significativas. Otros investigadores también han reportado, que el manejo orgánico influyó fuertemente en la actividad de las enzimas del suelo, pero no ejerció un efecto importante en las comunidades microbianas (Bowles et al. 2014).



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Además, otro estudio ha reportado que la biodiversidad en porcentaje de cobertura para sistemas de manejo orgánicos y sistemas de manejo convencional fueron 65,1% y 65,8%, respectivamente, dando que la riqueza de especies y el índice de dominancia observadas en orgánico y convencional no fueron significativamente diferentes (Perschina et al. 2015).

Por otro lado, también se han reportado diferencias significativas dentro de las comunidades microbianas del suelo, cuando éste se somete a distintos tipos de manejo. Por ejemplo, Hartmann et al. (2014) afirman que en la agricultura orgánica aumentó la riqueza de la microbiota del suelo en comparación con los suelos manejados convencionalmente bajo fertilización exclusivamente mineral. De manera similar, Reganold et al. (2010) mencionan que en los suelos de cultivos de fresa bajo manejo orgánico, la diversidad genética también fue significativamente mayor a los suelos bajo manejo convencional.

En el presente estudio no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre las comunidades microbianas evaluadas, posiblemente se le puede atribuir a la ausencia de laboreo en los suelo bajo los dos sistemas de manejo estudiados. En efecto, cuando la labranza es mínima, los residuos vegetales quedan en la superficie del suelo, lo que favorece la proliferación de hongos en los primeros milímetros del suelo (Lee y Pankhurst 1992). Adicionalmente, algunos autores mencionan que lo que más afecta a la población microbiana del suelo, tanto en su cantidad como en su actividad y en sus relaciones poblacionales es el cambio de la cobertura vegetal nativa por una cobertura de cultivos o de pastos (Jaramillo 2002). Se presume que los sistemas de manejo orgánico y convencional no influenciaron totalmente sobre la composición y diversidad de las comunidades microbianas de bacterias y hongos de los suelos en estudio.

No obstante, aunque no exista diferencias estadísticamente significativas en la composición y diversidad en hongos y bacterias en cultivos de cacao y café de los suelos bajo los dos sistemas de manejo, no se afirma que las dos comunidades microbianas sean exactamente idénticas en composición y diversidad, ya que en este estudio no se ha analizado a nivel de UTO (unidades taxonómicas operacionales). Es decir, puede aparentar que el cultivo orgánico y convencional



UNIVERSIDAD DE CUENCA

tengan la misma diversidad, pero no se sabe que tipos de microorganismos estén presentes en esos suelos, pudiendo ser microorganismos patógenos, benéficos, antagonistas, oportunistas, etc.

Los resultados conseguidos de los análisis físico-químicos, también muestran la ausencia de diferencias significativas entre los sistemas de manejo orgánico y convencional del suelo. En relación con esto, Shannon et al. (2002) también reportan que no existen diferencias significativas en estas propiedades en comparación a los dos sistemas de manejo. Sin embargo, Van Diepeningen et al. (2006), mencionan que el tipo de suelo influyó en los niveles de pH, y carbono orgánico, número de bacterias oligotróficas y de diferentes grupos de nematodos, así como en diferentes índices de diversidad.

Por otro lado, en nuestra investigación se observó que el porcentaje de materia orgánica fue alto para los dos sistemas de manejo, pudiendo tener un impacto beneficioso en el suelo, mejorando la estructura, porosidad, pH, densidades, fertilidad, la capacidad de Infiltración, y humedad del suelo, favoreciendo las condiciones para la vida microbiana en el suelo (Reganold et al. 2010) además, pudiendo explicar la similaridad en la diversidad y composición de la vida microbiana en estos suelos.

Es posible que otros factores climáticos y edáficos no tomados en cuenta para esta investigación sean los que también intervengan en la composición y diversidad de las comunidades microbianas y en las propiedades físico-químicas de los suelos.

De este modo, nuestra investigación y datos obtenidos no apoyan la hipótesis planteada, ya que no existen diferencias estadísticamente significativas en la diversidad y composición de las comunidades microbianas en los cultivos de cacao y café bajo sistemas de manejo orgánico y convencional.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

9. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El análisis general en este estudio no mostró diferencias estadísticamente significativas, a nivel de índices de diversidad, índices de composición o agrupamiento; ni en los análisis físico-químicos de los suelos en los dos sistemas de manejo. No obstante, se desconocen agrupaciones más específicas a nivel de unidades taxonómicas operacionales en las comunidades microbianas del suelo, ya que con esto se podría observar si existe alguna tendencia de agrupación por alguna variable en estudio.

Esta investigación constituye un aporte parcial al conocimiento de la diversidad y composición en los cultivos de cacao y café bajo los sistemas de manejo orgánico y convencional. Por lo tanto, se recomienda extender la investigación a nivel taxonómico. Además, se recomienda seleccionar sitios de cultivos con un manejo mayor de 5 años, ya sea orgánico y convencional, de preferencia con certificaciones de manejo.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Acosta, V; Mikha, MM; Vigil, MF. 2007. Microbial communities and enzyme activities in soils under alternative crop rotations compared to wheat-fallow for the Central Great Plains. *Applied Soil Ecology* 37(1-2): 41-52.

ANECACAO. 2015. Exportación Ecuatoriana De Cacao - 2015 Exportación Ecuatoriana De Cacao - 2015. 2015: 6p.

Bautista, F; Palacio, G. 2005. Caracterización y manejo de los suelos de la Península de Yucatán. Yucatán, Disponible en www.book.google.es

Benítez, S; Bentley, J; Bustamante, P; Sánchez, L; Corrales, L. 2007. Aislamiento de los microorganismos cultivables de la rizosfera de *Ornithogalum umbellatum* y evaluación del posible efecto biocontrolador en dos patógenos del suelo . *Nova* 5: 147-153.

Bevivino, A; Paganin, P; Bacci, G; Florio, A; Pellicer, MS; Papaleo, MC; Mengoni, A; Ledda, L; Fani, R; Benedetti, A; Dalmastri, C. 2014. Soil bacterial community response to differences in agricultural management along with seasonal changes in a Mediterranean region. *PLoS ONE* 9(8).

Blume, E; Bischoff, M; Reichert, JM; Moorman, T; Konopka, A; Turco, RF. 2002. Surface and subsurface microbial biomass, community structure and metabolic activity as a function of soil depth and season. *Applied Soil Ecology* 20(3): 171-181.

Bowles, TM; Acosta Martínez, V; Calderón, F; Jackson, LE. 2014. Soil enzyme activities, microbial communities, and carbon and nitrogen availability in organic agroecosystems across an intensively-managed agricultural landscape. *Soil Biology and Biochemistry* 68: 252-262.

Brussaard, L; de Ruiter, PC; Brown, GG. 2007. Soil biodiversity for agricultural sustainability. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 121(3): 233-244.

Burgess, T; Bihon, W; Wingfield, MJ; Wingfield, BD. 2009. Newsletter of the Mycological Society of America. *Inoculum* 60(December 2009): 1-10.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Bürgmann, H; Pesaro, M; Widmer, F; Zeyer, J. 2001. A strategy for optimizing quality and quantity of DNA extracted from soil. *Journal of Microbiological Methods* 45(1): 7-20.

Caldwell, AC; Silva, LCF; Da Silva, CC; Ouverney, CC. 2015. Prokaryotic diversity in the rhizosphere of organic, intensive, and transitional coffee farms in Brazil. *PLoS ONE* 10(6): 1-17.

Castillo, A; Sánchez, A; Cueva, A; Orellana, M. 2016. Puesta a punto de una técnica molecular para el estudio de hongos y bacterias totales del suelo en ecosistemas tropicales del sur del Ecuador. *Scielo* 34(1): 145-154.

Cedeño, R. 2005. Caracterización de Comunidades Bacterianas en sistemas de engorde de camarón mediante electroforesis en geles de gradiente denaturante (DGGE). no.133: 2.

Clayton, RA; Sutton, G; Hinkle Jr., PS; Bult, C; Fields, C. 1995. Intraspecific variation in small-subunit rRNA sequences in GenBank: why single sequences may not adequately represent prokaryotic taxa. *Int.J.Syst.Bacteriol.* 45(0020-7713 SB-M): 595-599.

Cornejo A., AS; Beatriz Rendón, MR. 2014. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos

Cottrell, MT; Waidner, LA; Yu, L; Kirchman, DL. 2005. Bacterial diversity of metagenomic and PCR libraries from the Delaware River. *Environmental Microbiology* 7(12): 1883-1895.

Daniel, R. 2004. The soil metagenome - A rich resource for the discovery of novel natural products. *Current Opinion in Biotechnology* 15(3): 199-204.

van Diepeningen, AD; de Vos, OJ; Korthals, GW; van Bruggen, AHC. 2006. Effects of organic versus conventional management on chemical and biological parameters in agricultural soils. *Applied Soil Ecology* 31(1-2): 120-135.

Eilers, KG; Debenport, S; Anderson, S; Fierer, N. 2012. Digging deeper to find unique microbial communities: The strong effect of depth on the structure of bacterial and



UNIVERSIDAD DE CUENCA

archaeal communities in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 50: 58-65.

Ejaz, S; Akram, W; Lim, CW; Lee, JJ; Hussain, I. 2004. Endocrine disrupting pesticides: a leading cause of cancer among rural people in Pakistan. *Experimental oncology* 26(2): 98-105.

Escalante, A. Gosset, G. Martínez, A. Bolívar, F. 2004. Diversidad bacteriana del suelo: métodos de estudio no dependientes del cultivo microbiano e implicaciones biotecnológicas. *Agrociencia (México)* Num.6 Vol.38 2004.

Estrade, J; Anger, C; Bertrand, M; Richard, G. 2010. Tillage and soil ecology: Partners for sustainable agriculture. *Soil and Tillage Research* 111(1): 33-40.

FAO. 2009. Guía para la descripción de suelos. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación 2009: 100.

De Felipe Antón, M. R. 2004. Interacciones microorganismos-suelo-planta en la preservación del Medio Ambiente y la Salud. *An. R. Acad. Nac. Farm.* 70: 743-776.

Fernández, R; Le, S. 1987. DGGE: electroforesis en gel con gradiente desnaturizante. 1987: 149-174.

Ferris, MJ; Muyzer, G; Ward, DM. 1996. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Profiles of 16S rRNA-Defined Populations Inhabiting a Hot Spring Microbial Mat Community. *Applied and Environmental Microbiology* 62(2): 340-346.

Figuerola, ELM; Guerrero, LD; Rosa, SM; Simonetti, L; Duval, ME; Galantini, JA; Bedano, JC; Wall, LG; Erijman, L. 2012. Bacterial Indicator of Agricultural Management for Soil under No-Till Crop Production. *PLoS ONE* 7(11): 1-12.

García, C; Saval, J; Baeza, F; Tenza, A. 2009. Propiedades Generales I Densidad Aparente y Densidad Real. 1: 1-12.

García, F; Morugán-Coronado, A; Zornoza, R; Cerdà, A; Scow, K. 2013. Changes in soil microbial community structure influenced by agricultural management practices in



UNIVERSIDAD DE CUENCA

a mediterranean agro-ecosystem. PLoS one 8(11): e80522.

González. 2012. Evaluación de comunidades microbianas edáficas oxidantes del amonio durante un ciclo de cultivo de papa criolla (*Solanum phureja*). 2012: 86.

González, H; Fierro, R. 2009. Sabias que Existen Microorganismos Que No Hemos Podido Cultivar ? 2009.

Gupta, A; Gopal, M; Thomas, G V.; Manikandan, V; Gajewski, J; Thomas, G; Seshagiri, S; Schuster, SC; Rajesh, P; Gupta, R. 2014. Whole genome sequencing and analysis of plant growth promoting bacteria isolated from the rhizosphere of plantation crops coconut, cocoa and arecanut. PLoS ONE 9(8).

Handelsman, J; Rondon, MR; Brady, SF; Clardy, J; Goodman, RM. 1998. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. Chemistry & biology 5(10): R245-R249.

Hartmann, M; Frey, B; Mayer, J; Mäder, P; Widmer, F. 2014. Distinct soil microbial diversity under long-term organic and conventional farming. The ISME journal 9(5): 1177-1194.

Heemsbergen, DA; Berg, MP; Loreau, M; van Hal, JR; Faber, JH; Verhoef, HA. 2004. Biodiversity Effects on Soil Processes Explained by Interspecific Functional Dissimilarity. Science 306(5698).

Hernández, R; Velázquez-Sepúlveda, I; Orozco-Mosqueda, MC; Santoyo, G. 2010. Metagenómica de suelos: grandes desafíos y nuevas oportunidades biotecnológicas. Phytón 79: 133-139.

Higa, T; Parr, JF. 1994. Beneficial and effective microorganisms for a sustainable agriculture and environment. International Nature Farming Research Center no.808: 1-16.

Higa, T; Wididana, GN. 1991. The Concept and Theories of Effective Microorganisms. Proceedings of the First International Conference on Kyusei Nature Farming 1991: 118-124.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Hussey, RS; Sasser, JN; Huisingh, D. 1972. Disc-Electrophoretic Studies of Soluble Proteins and Enzymes of *Meloidogyne incognita* and *M. arenaria*. *Journal of nematology* 4(3): 183-9.

ICCO. 2010. EX/142/6 30 July 2010. no.July: 2-3.

Jangid, K; Williams, MA; Franzluebbers, AJ; Sanderlin, JS; Reeves, JH; Jenkins, MB; Endale, DM; Coleman, DC; Whitman, WB. 2008. Relative impacts of land-use, management intensity and fertilization upon soil microbial community structure in agricultural systems. *Soil Biology and Biochemistry* 40(11): 2843-2853.

Jaramillo, D. 2002. Introducción a la ciencia del suelo. Facultad de ciencias. Universidad Nacional de Colombia 2002: 619.

Kisand, V; Andersson, N; Wikner, J. 2005. Bacterial freshwater species successfully immigrate to the brackish water environment in the northern Baltic. *Limnology and Oceanography* 50(3): 945-956.

Lazarevic, V; Gaïa, N; Girard, M; François, P; Schrenzel, J. 2013. Comparison of DNA Extraction Methods in Analysis of Salivary Bacterial Communities. *PLoS ONE* 8(7).

Lee, KE; Pankhurst, CE. 1992. Soil organisms and sustainable productivity. *Australian Journal of Soil Research* 30(6): 855-892.

Lin, XG; Yin, R; Zhang, HY; Huang, JF; Chen, RR; Cao, ZH. 2004. Changes of Soil Microbiological Properties Caused by Land Use Changing From Rice–Wheat Rotation to Vegetable Cultivation. *Environmental Geochemistry and Health* 26(2): 119-128.

Liu, J; Yu, Y; Cai, Z; Bartlam, M; Wang, Y. 2015. Comparison of ITS and 18S rDNA for estimating fungal diversity using PCR-DGGE. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 31(9): 1387-1395.

Marschner, P; Crowley, D; Yang, CH. 2004. Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. *Plant and Soil* 261(1/2): 199-208.

May, LA; Smiley, B; Schmidt, MG. 2001. Comparative denaturing gradient gel



UNIVERSIDAD DE CUENCA

electrophoresis analysis of fungal communities associated with whole plant corn silage. *Canadian Journal of Microbiology* 47(9): 829-841.

Mendes, R; Garbeva, P; Raaijmakers, JM. 2013. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews* 37(5): 634-663.

Mocali, S; Benedetti, A. 2010. Exploring research frontiers in microbiology: the challenge of metagenomics in soil microbiology. *Research in Microbiology* 161(6): 497-505.

Montaño, N; Sandoval, A; Ricalde, S; Sánchez, J. 2010. Los microorganismos: pequeños gigantes. *Revista Ciencia y cultura elementos* 77: 15-23.

Muyzer, G. 1999. Genetic fingerprinting of microbial communities – present status and future perspectives. *Microbial Biosystems: New Frontiers* 1999: 10.

Muyzer, G; Dewaal, EC; Uitterlinden, AG. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59(3): 695-700.

Muyzer, G; Smalla, K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* 73(1): 127-141.

Nogales, B. 2005. La microbiología del suelo en la era de la biología molecular: descubriendo la punta del iceberg. *Revista Ecosistemas* 14(2).

Orr, CH; Leifert, C; Cummings, SP; Cooper, JM. 2012. Impacts of Organic and Conventional Crop Management on Diversity and Activity of Free-Living Nitrogen Fixing Bacteria and Total Bacteria Are Subsidiary to Temporal Effects. *PLoS ONE* 7(12).

Perez A. y Landeros C. 2009. Agricultura y deterioro ambiental. *Elementos* 73(January 2009): 19-25.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Pershina, E; Valkonen, J; Kurki, P; Ivanova, E; Chirak, E; Korvigo, I; Provorov, N; Andronov, E. 2015. Comparative analysis of prokaryotic communities associated with organic and conventional farming systems. PLoS ONE 10(12): 1-16.

PROECUADOR. 2013. Análisis sectorial de café. Instituto de Promociones de Exportaciones e I 2013: 1-52.

Promas - Universidad de Cuenca. s.f. Procedimiento de selección y validación del método de ensayo. Cuenca, s.e., p.7.

Reganold, JP; Andrews, PK; Reeve, JR; Carpenter-Boggs, L; Schadt, CW; Alldredge, JR; Ross, CF; Davies, NM; Zhou, J. 2010. Fruit and soil quality of organic and conventional strawberry agroecosystems. PLoS ONE 5(9): 1-14.

Rosero, L. 2002. Cacao - Documents. Disponible en <http://myslide.es/documents/cacao-55a234ed70c80.html>

Rucks, L; García, F; Kaplán, A; Ponce de León, J; Hill, M. 2004. Propiedades físicas del suelo. Facultad De Agronomía Universidad De La República 2004: 68.

Rumpel, C; Kögel, I. 2011. Deep soil organic matter-a key but poorly understood component of terrestrial C cycle. Plant and Soil 338(1): 143-158.

Šantrůčková. Kaštovská. Kozlov. Kurbatova. Shibistova. Tatarinov and Lloyd. 2010. Vertical and horizontal variation of carbon pools and fluxes in soil profile of wet southern taiga in European Russia. Earth 6095(June): 357-369.

Schumacher, BA. 2002. Methods for the Determination of Total Organic Carbon (TOC) in Soils and Sediments: April 2002. no.April.

Shannon, D; Sen, a M; Johnson, DB. 2002. A comparative study of the microbiology of soils managed under organic and conventional regimes. Soil Use and Management 18: 274-283.

Silva, P; Acevedo, E; Silva, E. 2000. Manual De Estudio Y Ejercicios Relacionados Con El Agua En El Suelo. 2000: 2.

Singh, BK; Millard, P; Whiteley, AS; Murrell, JC. 2004. Unravelling rhizosphere–



UNIVERSIDAD DE CUENCA

microbial interactions: opportunities and limitations. *Trends in Microbiology* 12(8): 386-393.

Sotomayor, D. 2011. Estimación de los retornos de las inversiones realizadas por INIAP en investigación y transferencia de ... no.October 2011.

Suárez, Y. 2010. Análisis de la funcionalidad y diversidad microbiana en suelos dedicados al cultivo de papa criolla (*Solanum phureja*) mediante una aproximación metagenómica. 2010: 1-128.

Torres, AP; Camberato, D; Lopez, RG; Mickelbart, M. 2001. Medición de pH y Conductividad Eléctrica en Sustratos. *Purdue extension* 2001: 1-6.

Torsvik, V; Øvreås, L. 2002. Microbial diversity and function in soil: From genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* 5(3): 240-245.

Tringe, SG; Hugenholtz, P. 2008. A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. *Current Opinion in Microbiology* 11(5): 442-446.

Ushio, M; Miki, T; Balser, TC. 2013. A coexisting fungal-bacterial community stabilizes soil decomposition activity in a microcosm experiment. *PLoS ONE* 8(11): 1-7.

Visser, S; Parkinson, D. 1992. Soil biological criteria as indicators of soil quality: Soil microorganisms. *American Journal of Alternative Agriculture* 7(1-2): 33-37.

Waldrop, MP; Firestone, MK. 2006. Response of Microbial Community Composition and Function to Soil Climate Change. *Microbial Ecology* 52(4): 716-724.

Wardle, DA; Bardgett, RD; Klironomos, JN; Setälä, H; van der Putten, WH; Wall, DH. 2004. Ecological Linkages Between Aboveground and Belowground Biota. *Science* 304(5677).

Wintzingerode, F; Göbel, UB; Stackebrandt, E. 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* 21: 213-229.

Wu, B; Tian, J; Bai, C; Xiang, M; Sun, J; Liu, X. 2013. The biogeography of fungal communities in wetland sediments along the Changjiang River and other sites in



UNIVERSIDAD DE CUENCA

China. The ISME journal 7(7): 1299-309.

Z. Sabree, MR and JH. 2009. Metagenomic.

Zelles, L. 1999. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review. *Biology and Fertility of Soils* 29(2): 111-129.

Zornoza, R; Guerrero, C; Mataix-Solera, J; Scow, KM; Arcenegui, V; Mataix-Beneyto, J. 2009. Changes in soil microbial community structure following the abandonment of agricultural terraces in mountainous areas of Eastern Spain. *Applied Soil Ecology* 42(3): 315-323.

Zwart, G; Bok, J. 2004. Protocol DGGE. *Center for Limnology* 4(March): 1-6.

11. ANEXOS



Anexo 1: Café Orgánico Yunguilla 1



Anexo 2: Café Convencional Yunguilla 1



UNIVERSIDAD DE CUENCA



Anexo 3: Café Orgánico Guachapala – Romeral



Anexo 4: Café Convencional Guachapala - Romeral



UNIVERSIDAD DE CUENCA



Anexo 5: Café Orgánico Yunguilla 2



Anexo 6: Café Convencional Yunguilla 2



UNIVERSIDAD DE CUENCA



Anexo 7: Cacao Orgánico Tamarindo 1



Anexo 8: Cacao Convencional Tamarindo 1



UNIVERSIDAD DE CUENCA



Anexo 9: Cacao Orgánico Naranjal



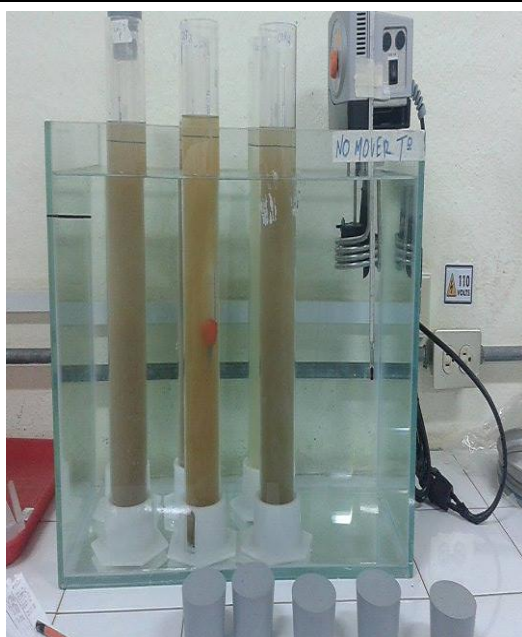
Anexo 10: Cacao Convencional Naranjal



UNIVERSIDAD DE CUENCA



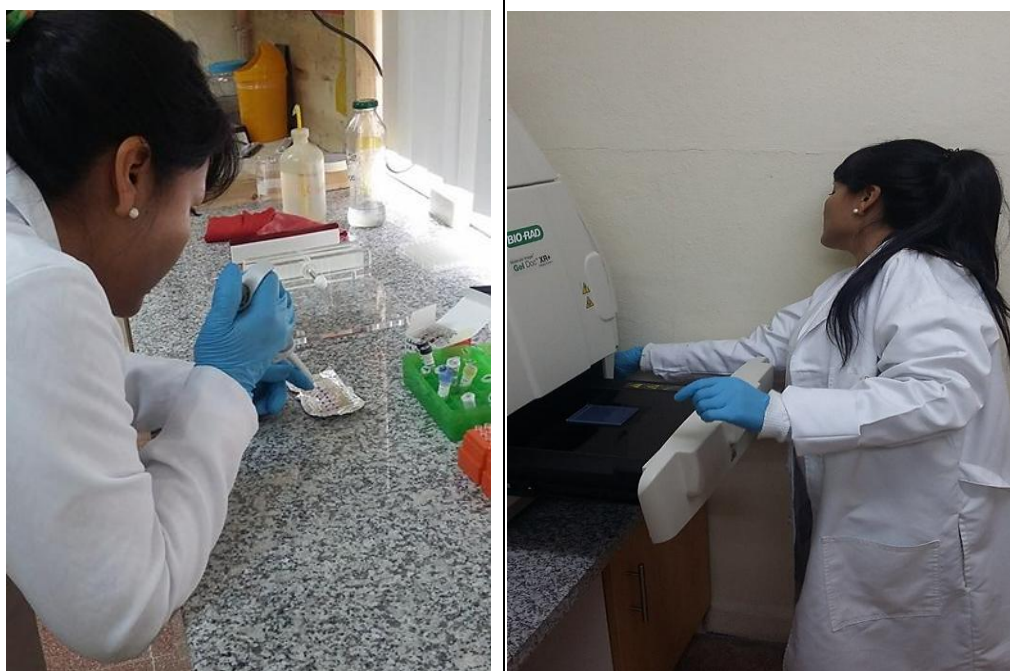
Anexo 11: Análisis físicos de los suelos 1



Anexo 12: Análisis físicos de los suelos 2



UNIVERSIDAD DE CUENCA



Anexo 13: Electroforesis en gel de agarosa